

**UNIVERSITE DE CORSE – PASCAL PAOLI  
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE**

**Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire**

Présentée par

**Anne-Laure FANCIULLINO**

**ETUDE DES DETERMINANTS GENETIQUES ET MOLECULAIRES  
DE LA VARIABILITE DES COMPOSITIONS EN CAROTENOÏDES AU  
SEIN DU GENRE *CITRUS***

Thèse dirigée par

**Dr. Patrick OLLITRAULT**

**Prof. Joseph CASANOVA**

**Soutenue le 26-06-2007**

**JURY**

**Mme Marie-Josephe AMIOT  
Mme Liliane BERTI  
M. Joseph CASANOVA  
M. Frédéric GAYMARD  
M. Patrick OLLITRAULT  
M. Manuel TALON**

**INSERM, Rapporteur  
Université de Corse, Examineur  
Université de Corse, Examineur  
INRA, Rapporteur  
CIRAD, Examineur  
IVIA, Examineur**

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout particulièrement à remercier :

la Collectivité Territoriale de Corse et le CIRAD pour avoir accepté de co-financer ce travail de thèse ;

Monsieur Robert Domaingue, Directeur de l'Unité Propre de Recherche Amélioration génétique d'espèces à Multiplication végétative du CIRAD, Monsieur Max Reynes, Directeur de l'Unité Mixte de Recherche Qualisud du CIRAD, Madame Dominique Agostini, Présidente du centre INRA de Corse, et Messieurs Olivier Pailly et Laurent Urban, Directeurs de l'Unité de Recherche Génétique et Écophysiologie de la Qualité des Agrumes de l'INRA de San Giuliano, pour m'avoir accueillie au sein ces unités de recherche ;

Monsieur Manuel Talon, Directeur du Centre de Génomique de l'IVIA, pour m'avoir accueillie à Valence (Espagne) et m'avoir permis d'effectuer des analyses au sein du laboratoire de biologie moléculaire.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Patrick Ollitrault, Chercheur CIRAD, Joseph Casanova, Professeur à l'Université de Corse, et Raphaël Morillon, Chercheur CIRAD, pour m'avoir confié ce sujet et pour avoir assuré l'encadrement de cette thèse. Je leur exprime ma reconnaissance et ma gratitude pour les conseils scientifiques et pédagogiques apportés au cours de ce travail.

Ma reconnaissance va aussi vers Madame Claudie Dhuique-Mayer, Chercheur CIRAD de l'UMR Qualisud, qui m'a encadrée et encouragée tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier Madame Liliane Berti, Professeur à l'Université de Corse, Monsieur Frédéric Gaymard, Directeur de Recherche à l'INRA à Montpellier, et Monsieur François Luro, Chargé de Recherche à l'INRA à San Giuliano, pour leur participation à mon comité de thèse et pour leurs conseils scientifiques.

Je remercie également Madame Marie-Joséphé Amiot, Directrice de Recherche de l'UMR INSERM/INRA à Marseille, et Monsieur Frédéric Gaymard pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et Madame Liliane Berti, Messieurs Joseph Casanova, Patrick Ollitrault et Manuel Talon pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier Messieurs Franck Curk, Ingénieur d'études à l'INRA à San Giuliano, Camille Jacquemond, Ingénieur de recherche à l'INRA à San Giuliano, Gilles Tison, Ingénieur d'études à l'INRA à San Giuliano et Yann Froelicher, Chercheur CIRAD à San Giuliano, pour leur disponibilité et leur soutien.

Je remercie également Gema Ancillo (IVIA, Espagne) pour sa contribution à l'étude de la diversité allélique du gène *Lcyb* et pour les analyses DHPLC.

Mes remerciements vont aussi à Anne-Laure Gancel et Pascaline Alter de l'UMR Qualisud à Montpellier, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du laboratoire de San Giuliano, Gilles, Elodie, Wafa Marie-Vincente, Bénédicte, Marion, Jean-Baptiste, Thierry, et Mourad, doctorants et stagiaires pour leur aide et leur bonne humeur quotidienne.

Je remercie également Enri, Javi et Paz pour leur accueil chaleureux dans le laboratoire de Valence.

Merci enfin à ma famille pour son aide quotidienne.

# SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION</b>	13
<b>I.1. AVANT-PROPOS</b>	14
<b>I.1.1. Importance économique des agrumes</b>	14
<b>I.1.1.1. La production mondiale d'agrumes et les quatre grands bassins producteurs</b>	14
<b>I.1.1.2. Les spécificités des grandes zones de production et les enjeux pour le commerce des agrumes</b>	14
<b>I.1.2. Amélioration de la qualité des agrumes</b>	16
<b>I.1.2.1. Les composantes de la qualité</b>	16
<b>I.1.2.2. Les programmes de création variétale</b>	17
<b>I.1.3. Importance des caroténoïdes dans la qualité des agrumes</b>	19
<b>I.1.3.1. les caroténoïdes, déterminants majeurs de la couleur des fruits</b>	19
<b>I.1.3.2. Les caroténoïdes, micronutriments participant à diverses fonctions biologiques</b>	20
<b>I.2. ETAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES</b>	23
<b>I.2.1. Diversité génétique des agrumes cultivés</b>	23
<b>I.2.1.1. Classification des agrumes</b>	23
<b>I.2.1.2. Utilisation des marqueurs biochimiques et moléculaires</b>	26
<b>I.2.1.3. Relations phylogénétiques entre les huit espèces cultivées d'agrumes</b>	26
<b>I.2.1.4. Origine de la diversification intraspécifique</b>	27
<b>I.2.2. Les caroténoïdes chez les plantes supérieures et les agrumes</b>	28
<b>I.2.2.1. Localisation, rôle</b>	28
<b>I.2.2.2. Propriétés physicochimiques des caroténoïdes, incidence sur les méthodes d'analyse</b>	30
<b>I.2.2.3. Compositions en caroténoïdes des agrumes et facteurs de variation</b>	33
I.2.2.3.1. Développement des fruits et maturation	33
I.2.2.3.2. Compositions en caroténoïdes dans la pulpe des fruits	34
<b>I.2.3. Biosynthèse des caroténoïdes</b>	38
<b>I.2.3.1. Biosynthèse des précurseurs</b>	38
I.2.3.1.1. La voie du mévalonate	39
I.2.3.1.2. La voie du méthylérythritol phosphate (MEP)	39
I.2.3.1.3. Du diphosphate d'isopentényle au diphosphate de géranylgeranyle	41
<b>I.2.3.2. Gènes et enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes</b>	42
I.2.3.2.1. Gène codant pour la phytoène synthétase (PSY)	44
I.2.3.2.2. Gènes codant pour la phytoène désaturase (PDS) et la ζ-carotène désaturase (ZDS)	44
I.2.3.2.3. Gène codant pour la caroténoïde isomérase (CRTISO)	45
I.2.3.2.4. Gènes codant pour la lycopène β-cyclase (LCY-b) et la lycopène ε-cyclase (LCY-e)	46
I.2.3.2.5. Gènes codant pour la β-carotène hydroxylase (HY-b) et la ε-carotène hydroxylase (HY-e)	47
I.2.3.2.6. Gène codant pour la zéaxanthine époxydase (ZEP)	47
I.2.3.2.7. Gène codant pour la néoxanthine synthétase (NSY)	48
<b>I.2.3.3. Catabolisme des caroténoïdes</b>	48
I.2.3.3.1. Réactions enzymatiques	48
I.2.3.3.2. Autres dégradations	50
<b>I.2.4. Mécanismes de régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans les fruits et en particuliers dans les sacs à jus des fruits d'agrumes</b>	50
<b>I.2.4.1. Rôle de l'expression des gènes, régulation au niveau transcriptionnel</b>	51
I.2.4.1.1. Expression des gènes de biosynthèse et relation avec les compositions en	

caroténoïdes des fruits et en particuliers des fruits d'agrumes	51
1.2.4.1.2. Expression des gènes responsables de la formation des précurseurs ou des gènes intervenant dans le catabolisme et relations avec les compositions en caroténoïdes	54
1.2.4.2. Rôle du polymorphisme entre les différents allèles (modification de l'expression du gène, modification de la séquence protéique)	56
1.2.4.3. Rôle des produits synthétisés (rétrocontrôles)	58
1.2.4.4. Rôle de la lumière et régulation au niveau transcriptionnel	58
1.2.4.5. Rôle des compartiments de stockage (chloroplastes, chromoplastes) et des protéines associées	58
1.3. PROBLEMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS	60
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b>	62
<b>II.1. ANALYSES DES CAROTENOÏDES</b>	63
II.1.1. Matériel végétal	63
II.1.2. Analyse des caroténoïdes par HPLC	63
II.1.2.1. Extraction-saponification des caroténoïdes des fruits	63
II.1.2.2. Analyses chromatographiques ; identification et quantification des molécules	64
<b>II.2. ANALYSES RFLP</b>	65
II.2.1. Matériel végétal	65
II.2.2. Préparation des membranes	66
II.2.3. Préparation des sondes	66
II.2.4. Hybridation des membranes	68
II.2.5. Vérification de la présence de sites de restriction dans les séquences des sondes	69
<b>II.3. ANALYSES SSR</b>	70
II.3.1. Matériel végétal	70
II.3.2. Amplification des motifs microsatellites et migration sur gel de polyacrylamide	70
<b>II.4. CLONAGES ET SEQUENÇAGES</b>	71
II.4.1. Matériels	71
II.4.2. Amplification par PCR des fragments à cloner	71
II.4.3. Clonage des fragments purifiés	72
II.4.4. Extraction des plasmides et vérification de l'identité des fragments clonés par PCR	72
<b>II.5. DIVERSITE ALLELIQUE DU GENE <i>Lcy-b</i>, ANALYSES DHPLC</b>	73
<b>II.6. PCR EN TEMPS REEL</b>	74
II.6.1. Matériel végétal	74
II.6.2. Définition des amorces	75
II.6.3. Quantification des ARN totaux	76
II.6.4. Réaction de PCR en temps réel	76
II.6.5. Quantification relative des ARNm	77
<b>II.7. ANALYSES STATISTIQUES</b>	79
II.7.1. Analyse de variance	79
II.7.2. Classification automatique	80
II.7.3. Analyse en composantes principales	81
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	82
<b>III.1. STRUCTURATION DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE EN RELATION AVEC L'HISTOIRE DES AGRUMES</b>	83

III.1.1. Résumé	83
III.1.2. Article	84
<b>III.2. ORIGINE DE LA DIFFERENCIATION PHENOTYPIQUE INTERSPECIFIQUE, ORIGINE PHYLOGENETIQUE DES GENES DE LA CHAINE DE BIOSYNTHESE, ROLE DE L'EXPRESSION DES GENES</b>	96
III.2.1. Origine phylogénétique des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes	96
III.2.1.1. Résumé	97
III.2.1.2. Article	97
III.2.2. Diversité allélique du gène <i>Lcy-b</i>	111
III.2.2.1. Introduction	111
III.2.2.2. Résultats et discussion	111
III.2.2.2.1. Analyse de la diversité du gène <i>Lcy-b</i> par DHPLC	111
III.2.2.2.2. Variabilité de séquence entre les taxons de base et structure allélique de l'oranger	114
III.2.3. Rôle du niveau d'expression de sept gènes de biosynthèse dans la diversité des compositions en caroténoïdes au niveau interspécifique, exemple de <i>C. sinensis</i> , <i>C. limon</i> et <i>C. maxima</i>	117
III.2.3.1. Introduction	117
III.2.3.2. Résultats et discussion	119
III.2.3.2.1. Diversité des compositions en caroténoïdes des jus de trois variétés représentant trois espèces d'agrumes	119
III.2.3.2.2. Expression de sept gènes de biosynthèse dans les sacs à jus de trois variétés représentant trois espèces d'agrumes	121
III.2.3.2.3. Relations entre le niveau d'expression de sept gènes et la diversité des compositions en caroténoïdes au niveau interspécifique	124
<b>III.3. ORIGINE DE LA DIFFERENCIATION PHENOTYPIQUE INTRASPECIFIQUE, ROLE DE L'EXPRESSION DES GENES DE BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES</b>	126
III.3.1. Rôle de l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes	126
III.3.1.1. Résumé	127
III.3.1.2. Article	128
III.3.2. Diversité allélique du gène <i>Lcy-b</i> chez quatre variétés d'orange	142
III.3.2.1. Introduction	142
III.3.2.2. Résultats et Discussion	143
III.3.2.2.1. Clonage et séquençage du gène <i>Lcy-b</i> chez quatre oranges	143
III.3.2.2.2. Discussion des relations diversité allélique du gène <i>Lcy-b</i> chez les oranges et compositions en caroténoïdes	149
<b>IV. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	151
<b>IV.1 DISCUSSION GENERALE</b>	152
IV.1.1. Structuration de la diversité des compositions en caroténoïdes dans les jus des agrumes cultivés	152
IV.1.1.1. Rôle du facteur génétique	152
IV.1.1.2. Relation entre diversité des profils en caroténoïdes et diversité génétique des agrumes cultivés, hypothèse sur les liens entre le processus de diversification phénotypique et l'évolution des agrumes cultivés	154
IV.1.1.3. Relations entre les profils en caroténoïdes et les étapes de la voie de biosynthèse, hypothèse sur les étapes clés et leurs régulations	156
IV.1.2. Diversité phylogénétique des principaux gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes	158
IV.1.2.1. Nombre de copies de sept gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes	158
IV.1.2.2. Cohérence entre les relations phylogénétiques inférées pour ces sept	

gènes et les hypothèses sur l'origine des espèces d'agrumes cultivées.....	161
IV.1.2.3. Relations entre la diversité phylogénétique pour ces sept gènes et la diversité phénotypique au niveau interspécifique.....	162
IV.1.3. Diversité d'expression des gènes de la voie du MEP et de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.....	164
IV.1.3.1. Relations expression des gènes et différenciation phénotypique intraspécifique, exemple des oranges.....	165
IV.1.3.2. Relations expression des gènes et phénotypes au niveau interspécifique, exemple d'une orange, d'un citron et d'un pamplemousse.....	167
IV.2. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	170
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	175
VI. ANNEXES.....	189

## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Comparaison des molécules de $\beta$ -carotène et de vitamine A.	20
<b>Figure 2.</b>	Taxonomie de la sous-famille des <i>Aurantioideae</i> d'après SWINGLE et REECE (1967).	23
<b>Figure 3.</b>	Différentes parties d'un agrume d'après PRALORAN (1971).	23
<b>Figure 4.</b>	Diversité pomologique des 25 génotypes analysés.	25
<b>Figure 5.</b>	Comparaison des chloroplastes de la mangue ( <i>Mangifera indica</i> ), de la carotte ( <i>Daucus Carota</i> ) et du kumquat ( <i>Fortunella margarita</i> ).	28
<b>Figure 6.</b>	Structure des caroténoïdes.	29
<b>Figure 7.</b>	Spectres d'absorption dans l'UV et le visible des caroténoïdes.	31
<b>Figure 8.</b>	Les trois stades de développement des oranges d'après BAIN (1958) et d'après SPIEGEL-ROY et GOLDSCHMIDT (1996).	32
<b>Figure 9.</b>	Schéma général de la biosynthèse des précurseurs des caroténoïdes.	37
<b>Figure 10.</b>	Synthèse du diphosphate d'isopentényle par la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).	38
<b>Figure 11.</b>	Synthèse du phytoène à partir du diphosphate d'isopentényle.	41
<b>Figure 12.</b>	Schéma général de la synthèse et du catabolisme des caroténoïdes chez les agrumes.	41
<b>Figure 13.</b>	Les étapes de déshydrogénation du phytoène et synthèse du <i>trans</i> -lycopène.	43
<b>Figure 14.</b>	Les étapes de cyclisation du lycopène.	45
<b>Figure 15.</b>	Les étapes de la synthèse des xanthophylles.	46
<b>Figure 16.</b>	Utilisation de la violaxanthine pour la synthèse de l'acide abscissique.	48
<b>Figure 17.</b>	Mécanismes de déshydrogénation du phytoène et régénération des cofacteurs des enzymes PDS et ZDS dans les chloroplastes chez <i>Lycopersicon esculentum</i> ou <i>Arabidopsis thaliana</i> .	56
<b>Figure 18.</b>	Détermination des <i>crossing points</i> (a) et relation entre cp et log de la concentration en ADN (b).	78
<b>Figure 19.</b>	Courbe de calibration pour le gène <i>Hy-b</i> obtenue à partir d'une série de dilutions d'un standard.	79
<b>Figure 20.</b>	Classification des 25 génotypes étudiés sur la base de la diversité de séquence du gène <i>Lcy-b</i> analysée par DHPLC.	113
<b>Figure 21.</b>	Classification obtenue sur la base des séquences du gène <i>Lcy-b</i> isolées chez les trois taxons de base et chez l'orange Cara Cara en utilisant une classification hiérarchique ascendante et l'indice de Kimura.	115
<b>Figure 22.</b>	Expression des gènes <i>Dxs</i> , <i>Psy</i> , <i>Pds</i> , <i>Zds</i> , <i>Lcy-b</i> , <i>Hy-b</i> et <i>Zep</i> dans les sacs à jus de trois espèces d'agrumes.	122
<b>Figure 23.</b>	Comparaison des séquences des allèles 1 et 2 du gène <i>Lcy-b</i> isolés chez l'orange Cara Cara navel/Sanguinelli.	145
<b>Figure 24.</b>	Comparaison des séquences d'acides aminés obtenues à partir des allèles 1 et 2 du gène <i>Lcy-b</i> isolés chez l'orange Cara Cara/Sanguinelli.	147
<b>Figure 25.</b>	Classification des séquences du gène <i>Lcy-b</i> isolées chez les oranges.	148
<b>1<sup>er</sup> article :</b>		
<b>Figure 1.</b>	Diversity of carotenoid profiles of the 25 genotypes on the basis of the presence or absence for carotenoids.	90
<b>Figure 2.</b>	Diversity of carotenoid profiles of the 25 genotypes on the basis of carotenoid contents.	91
<b>Figure 3.</b>	Carotenoid biosynthetic pathway obtained through the qualitative carotenoid composition in 25 citrus genotypes.	92



## **2<sup>ème</sup> article :**

<b>Figure 1.</b>	Carotenoid biosynthetic pathway in plants.....	99
<b>Figure 2.</b>	RFLP hybridization pattern for the combination EcoRV / Lcy-b. 10 µg of genomic DNA from 25 Citrus genotypes (numbers are identified in table 1) were digested with EcoRV.....	101
<b>Figure 3.</b>	Global organisation of genetic diversity based on RFLP markers defined from expressed sequences of seven carotenoid biosynthetic genes.....	102
<b>Figure 4.</b>	Silver-stained 5 % acrylamide gel showing polymorphism at locus 1210 (A, Lcy-b gene) and 1388 (B, Hy-b gene) in 25 Citrus genotypes.....	104
<b>Figure 5.</b>	Representation of diversity based on RFLP and SSR analysis for the Hy-b gene.....	105
<b>Figure 6.</b>	Representation of the diversity based on RFLP analysis around the Zep gene....	106

## **3<sup>ème</sup> article :**

<b>Figure 1.</b>	Fruits of four oranges differing in flesh colour.....	131
<b>Figure 2.</b>	Chromatograms at 450 nm of carotenoids from juices of four orange varieties (A, Shamouti ; B, Sanguinelli ; C, Cara Cara navel ; D, Huang pi Chen).....	135
<b>Figure 3.</b>	Carotenoid contents in the juice sacs of 4 orange varieties, Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel and Huang pi Chen orange at the development stage III.....	136
<b>Figure 4.</b>	mRNA levels of Dxs, Psy, Pds, Zds, Lcy-b, Hy-b, and Zep in juice sacs of four orange varieties, Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel, and Huang pi Chen orange at three maturation stages, A, August; N, November and F, February....	137
<b>Figure 5.</b>	Orange differentiation using PCA of carotenoids expressed as percentage of total carotenoid area in February and mRNA levels of seven genes in February.....	138

## TABLE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b>	Composition en caroténoïdes des agrumes (fruits prélevés à maturité commerciale).....	34
<b>Tableau 2.</b>	Composition en caroténoïdes des oranges Valencia (fruits prélevés à maturité commerciale).....	37
<b>Tableau 3.</b>	Récapitulatif des caractéristiques des gènes et enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez trois espèces: <i>Citrus sinensis</i> (ou <i>C.unshiu</i> ), <i>Lycopersicon esculentum</i> et <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
<b>Tableau 4.</b>	Préparation des solutions de préhybridation et d'hybridation.....	68
<b>Tableau 5.</b>	Réaction produit PCR purifié/vecteur.....	72
<b>Tableau 6.</b>	Couples d'amorces définis pour les analyses DHPLC.....	73
<b>Tableau 7.</b>	Stades de développement des fruits récoltés.....	74
<b>Tableau 8.</b>	Etapes du programme de PCR en temps réel.....	76
<b>Tableau 9.</b>	Concentrations des principaux caroténoïdes dans les jus de trois espèces.....	120
<b>Tableau 10.</b>	Teneurs en caroténoïdes totaux dans les jus de trois espèces.....	120
<b>Tableau 11.</b>	Pourcentages des principaux caroténoïdes dans les jus de trois espèces.....	120
<b>Tableau 12.</b>	Caractéristiques des séquences codantes du gène <i>Lcy-b</i> , isolées chez <i>Citrus sinensis</i> et disponibles dans les bases de données.....	148

### 1<sup>er</sup> article :

<b>Table 1.</b>	Genotypes used for juice preparation.....	86
<b>Table 2.</b>	Characterization of maturity stage of the genotypes used.....	87
<b>Table 3.</b>	Spectral characteristics of carotenoids found in juices of 25 genotypes.....	87
<b>Table 4.</b>	Carotenoid contents (Milligrams per Liter) in juices of 25 genotypes.....	88

### 2<sup>ème</sup> article:

<b>Table 1.</b>	Genotypes used for RFLP and SSR analyses.....	100
<b>Table 2.</b>	List of primers used for cDNA amplification and RFLP analysis.....	101
<b>Table 3.</b>	Primers used for SSR analysis.....	101
<b>Table 4.</b>	Global description of RFLP profiles observed using cDNA of seven genes of the carotenoid biosynthetic pathway as probes.....	103
<b>Table 5.</b>	Proposed genotypes and proposed phylogenetic origin of carotenoid biosynthetic genes of hybrid Citrus species.....	103

### 3<sup>ème</sup> article:

<b>Table 1.</b>	List of genotypes.....	131
<b>Table 2.</b>	Characteristics of orange juices in February.....	131
<b>Table 3.</b>	List of primer pairs used for gene expression analysis by RT-PCR.....	132
<b>Table 4.</b>	Chromatographic and spectral characteristics of carotenoids found in orange juices.....	134
<b>Table 5.</b>	Correlation matrix in PCA.....	138

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABA : acide abscissique  
ADN : acide désoxiribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire d'un ARN  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messager  
ATP : adénosine triphosphate

BHT: *ter*-butylhydroxytoluène

CCD : caroténoïde dioxygénase  
CCS : capsanthine/capsorubine synthétase  
CDP-ME : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol  
CDP-MEP : 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol  
CMK : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase  
CrtB : phytoène synthétase bactérienne  
CRTI : phytoène désaturase bactérienne  
CRTISO : caroténoïde isomérase  
CYC-b : lycène  $\beta$ -cyclase spécifique des chromoplastes de la tomate

DEPC : pyrocarbonate de diéthyle  
DMAPP : diphosphate de diméthylallyle  
DX5P : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate  
DXR : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase  
DXS : 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate synthétase

FAD : flavine adénine dinucléotide (forme oxydée)  
FPP : diphosphate de farnésyle

GAP : glycéraldéhyde 3-phosphate  
GGPP : diphosphate de géranylgeranyle  
GGPS : diphosphate de géranylgeranyle synthétase  
GPP : diphosphate de géranyle  
GPS : diphosphate de géranyle synthétase

HDR : diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle réductase  
HDS : diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle synthétase  
HMBPP : diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle  
HMGC<sub>o</sub>A : 3-hydroxy-3-méthylglutaryle-CoA  
HPLC: chromatographie liquide haute performance  
HY-b :  $\beta$ -carotène hydroxylase  
HY-e :  $\epsilon$ -carotène hydroxylase

IPP : diphosphate d'isopentényle  
IPPi : diphosphate d'isopentényle isomérase

LCD : lycopène dioxygénase  
LCY-b : lycopène  $\beta$ -cyclase  
LCY-e : lycopène  $\epsilon$ -cyclase  
LOD: limite de détection  
LOQ : limite de quantification

MCS : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthétase  
MCT : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl-transférase  
ME4P : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate  
ME-cPP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate  
MEP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate  
MVA : mévalonate  
MVAP : phosphate de mévalonate  
MVAPP : diphosphate de mévalonate

NADPH : nicotiamine adénine dinucléotide (forme réduite)  
NCED : 9-*cis*-époxy hydroxy caroténoïde dioxygénase  
NSY : néoxanthine synthétase

PDS : phytoène désaturase  
PSY : phytoène synthétase  
PTOX : oxydase terminale plastidiale

RAPD : randomly amplified polymorphic DNA  
RFLP : restriction fragment length polymorphism

SCAR: sequence-characterized amplified region  
SSCP: single strand conformation polymorphism  
SSR: simple sequence repeats

VDE : violaxanthine de-époxydase

ZCD : zéaxanthine dioxygénase  
ZDS :  $\zeta$ -carotène désaturase  
ZEP : zéaxanthine époxydase

# **I. INTRODUCTION**

## **I.1. AVANT-PROPOS**

### **I.1.1. Importance économique des agrumes**

#### **I.1.1.1. La production mondiale d'agrumes et les quatre grands bassins producteurs**

La production mondiale d'agrumes s'élevait à environ 109 millions de tonnes en 2004-2005 (source FAO) ce qui la plaçait au premier rang des productions fruitières devant le groupe banane et plantain (106 millions de tonnes) et loin devant le raisin et la pomme (respectivement 67 et 61 millions de tonnes). Les oranges représentent 60% de la production totale, les petits agrumes 22%, les citrons 12% et les pomelos 4%. De plus, 60% des agrumes produits sont autoconsommés, 30% sont transformés et 10% sont échangés au niveau international (source FAO).

L'aire de culture des agrumes est très vaste : elle s'étend du 40<sup>ème</sup> parallèle nord au 40<sup>ème</sup> parallèle sud. Cependant, quatre grandes zones sont à l'origine des deux tiers de la production mondiale : le Brésil, le bassin méditerranéen, la Chine et les Etats-Unis (IMBERT, 2006a). Le Brésil reste le premier bassin de production avec une récolte d'environ 20 millions de tonnes par an d'agrumes. De 1980 à 1990, la production a connu une forte augmentation, mais cette production s'est stabilisée dans les années 90 avec l'apparition de problèmes phytosanitaires. Le bassin méditerranéen représente la deuxième zone de production avec environ 19 millions de tonnes d'agrumes produits par an. Dans cette zone, la production connaît une forte croissance. La Chine serait le troisième bassin de production avec 14-15 millions de tonnes d'agrumes qui sont majoritairement autoconsommés. Enfin, les Etats-Unis représentent le quatrième bassin producteur avec une production d'environ 11 millions de tonnes par an. Cette production a été marquée par une forte diminution depuis la campagne 2003 / 2004 due à la fois à des problèmes phytosanitaires et au passage de plusieurs cyclones.

#### **I.1.1.2. Les spécificités des grandes zones de production et les enjeux pour le commerce des agrumes**

Le Brésil et les Etats-Unis sont aussi les principaux pays transformateurs. Parmi les agrumes, c'est surtout l'orange qui est transformée : 23,8 millions de tonnes d'oranges sont transformées. Le Brésil, qui transforme 11,3 millions de tonnes d'oranges et les Etats-Unis 9,2 millions de tonnes, contrôlent plus de 85% de la production mondiale de jus d'oranges

(IMBERT, 2006a). Les conditions environnementales expliquent cette orientation vers la transformation. En effet, les oranges produites en région tropicale (Brésil, Floride), caractérisées par une teneur en jus élevée, une pulpe et une peau peu colorées (faibles concentrations en caroténoïdes et anthocyanes), sont plus intéressantes pour la fabrication des jus que pour la consommation en frais.

Le principal produit industriel est le jus d'orange concentré à 65 degré Brix. Cependant, des produits à plus haute valeur ajoutée et de meilleure qualité comme le jus simple ou les produits de quatrième gamme (*fresh cut Citrus*) gagnent du terrain (IMBERT, 2006a). L'augmentation de la transformation des agrumes (augmentation de 163% durant la période 1970-2005) s'explique principalement par une explosion de la demande en jus dans les pays développés (Union Européenne, Amérique du Nord, et Japon). Dans ces pays, pour l'orange et le citron, l'évolution de la demande au profit des jus a entraîné parallèlement une diminution du marché du frais.

Le bassin méditerranéen est plus spécialisé dans les échanges de fruits frais. Les conditions climatiques et principalement les hivers frais permettent la production d'oranges et de petits agrumes caractérisés par un bon équilibre sucres/acides (ALBERTINI *et al.*, 2006) et une coloration orange vif typique (DHUIQUE-MAYER *et al.*, 2005). Cette spécificité explique la spécialisation dans le commerce mondial des agrumes frais. Ainsi, la méditerranée contrôle 55% du commerce mondial des oranges, 70% de celui des petits agrumes et 40% de celui des citrons (IMBERT, 2006a).

Durant la période 1970-2000, le commerce mondial des agrumes frais a augmenté d'environ 80% (source FAO). Les oranges représentent aussi la plus grande part des fruits frais échangés (4,4 millions de tonnes en 2000). Cependant, la croissance de ce marché s'explique surtout par l'augmentation des échanges de petits agrumes (2,5 millions de tonnes en 2000). L'Asie et en particulier la Chine produisent 60% des petits agrumes au niveau mondial tandis que le bassin méditerranéen génère 22% de la production. Cependant, les fruits produits en Chine sont surtout autoconsommés et la méditerranée contrôle ainsi près des trois quarts des échanges des petits agrumes. Le dynamisme du marché des petits agrumes est soutenu par la création variétale et la commercialisation d'une large gamme de petits agrumes avec des variétés précoces et des variétés tardives. Les prévisions de campagne d'agrumes 2006-2007 prévoient une production record pour les pays du bassin méditerranéen avec une production d'environ 19 millions de tonnes d'agrumes (IMBERT, 2006b). Cette production record est due à une augmentation des productions de petits agrumes, oranges et citrons

principalement en Espagne, Turquie et Egypte. En Espagne, une rénovation des vergers est en cours avec le développement de variétés, de qualité améliorée, précoces (Oroval, Marisol, Oronules, Cleménruby, etc. pour les petits agrumes) ou tardives (Nour, Hernandine, pour les clémentines, Navelate cultivar Powell pour les oranges, Ortanique pour les tangors). Ainsi, avec l'augmentation des volumes produits, la concurrence risque d'être sévère même si les marchés de l'Europe de l'Est et de l'Asie constituent encore des réservoirs de développement de la consommation.

Etant donné la période de juvénilité des agrumes (5-7 ans), il est important de pouvoir orienter les programmes de créations variétales pour pouvoir répondre aux différents enjeux qui sont : la demande croissante de fruits de qualité, la recherche de nouveaux marchés, les contraintes biotiques (Tristeza, Phytophthora, Chancre citrique etc.) ou abiotiques (sécheresse, salinité etc.) croissantes.

## **I.1.2 Amélioration de la qualité des agrumes**

### **I.1.2.1.....Les composantes de la qualité**

La qualité d'un produit désigne la qualité organoleptique (texture, couleur, odeur, flaveur), la qualité sanitaire, la qualité nutritionnelle et la qualité de service ou d'usage (transformation, conservation). Le consommateur est de plus en plus exigeant en ce qui concerne la qualité des produits qu'il consomme, et notamment la qualité organoleptique qu'il perçoit en premier lieu. La qualité organoleptique des agrumes dépend de nombreux facteurs : la couleur (caroténoïdes, anthocyanes et chlorophylles), les teneurs en sucres, en acides, en arômes, le pourcentage de jus, l'absence de pépins, etc. Les composés participant à la qualité nutritionnelle des agrumes sont les vitamines d'une part et les composés antioxydants d'autre part. La vitamine C, les caroténoïdes (provitamines A) et l'acide folique (vitamine B9) sont les principales vitamines caractéristiques des agrumes. Les différentes catégories de composés antioxydants sont : la vitamine C, les caroténoïdes et les composés phénoliques. Les paramètres participant à la qualité organoleptique ou nutritionnelle des agrumes sont eux-mêmes influencés par les conditions environnementales, les pratiques culturales, les conditions de récolte et de conservation et par la sélection des variétés. Les programmes de création variétale intègrent ainsi ces paramètres et exploitent la diversité génétique des agrumes pour créer et sélectionner des variétés de haute qualité organoleptique et nutritionnelle.



### **I.1.2.2.....Les programmes de création variétale**

Les programmes de création variétale concernent d'une part l'amélioration des porte-greffe et d'autre part l'amélioration des cultivars. En effet, en plantations commerciales, les agrumes sont cultivés sous la forme d'une association cultivar / porte-greffe. Les porte-greffe sont responsables de l'adaptation des agrumes aux différentes conditions pédoclimatiques et des résistances à de nombreux pathogènes. Ainsi, les travaux de sélection correspondent à la recherche de porte-greffe tolérants au sel, s'adaptant aux sols alcalins et acides ou encore résistants aux *Phytophthora* et à la Tristeza. Les porte-greffe participent également à la qualité des fruits. Ainsi, les citranges (hybrides *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) ont été sélectionnés pour l'amélioration de la qualité des petits agrumes et des oranges et aussi pour leur résistance à la Tristeza. Pour l'amélioration des cultivars, les critères de sélection concernent la qualité organoleptique (couleur, pourcentage de jus, teneurs en sucres et acides et absence de pépins principalement), la recherche de variétés précoces et de variétés tardives et la résistance au froid. Par exemple, la sélection de fruits sans pépin s'est traduite par la recherche de stérilités femelles ou mâles (exemple des orangers, *Citrus sinensis*, variétés Washington Navel, Hamlin, Valencia ou des pomelos, *Citrus paradisi*, variétés Marsh et Thompson ou encore du citronnier *Citrus limon*, variété Eurêka) ou par la recherche de variétés triploïdes. Cependant, les programmes utilisant la reproduction sexuée sont limités par la complexité des systèmes de reproduction des agrumes.

Les systèmes de reproduction chez les agrumes sont variés et complexes. Le premier caractère à souligner est la polyembryonnie ou apomixie facultative présente chez de nombreuses espèces telles que *Citrus sinensis*, la majorité des variétés de *Citrus reticulata*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium* et *Poncirus trifoliata*. De nombreuses graines renferment plusieurs embryons : l'embryon zygotique et les embryons surnuméraires issus des cellules du nucelle, donc identiques au génotype maternel. Ces graines polyembryonnées produisent généralement 2 à 3 plantules. L'embryon sexué se retrouve en compétition avec les embryons nucellaires pour l'espace et les éléments nutritifs. Seules deux espèces, selon Swingle, *Citrus medica* et *Citrus grandis*, ne présentent que des variétés monoembryonnées. Les autres problèmes rencontrés lors de l'hybridation sexuée sont la stérilité gamétique affectant les pièces mâles ou femelles et l'incompatibilité gamétophytique (auto et inter-incompatibilité) (OLLITRAULT et DE ROCCA SERRA, 1992a et b). Ces éléments sont des freins à la mise en place de programmes de création variétale.

Récemment, le développement d'une nouvelle technique : l'hybridation somatique (qui correspond à la fusion de protoplastes, cellules végétales dépourvues de parois pectocellulosiques) a ouvert de nouvelles perspectives dans les programmes de création variétale. Elle permet un accroissement de la diversité utile des pools génétiques des espèces cultivées avec la possibilité de réaliser des hybridations interspécifiques et intergénériques sans être confrontée aux incompatibilités rencontrées dans l'hybridation sexuée. C'est aussi, pour les agrumes, la possibilité d'augmenter le pool des tétraploïdes utilisés pour l'obtention de triploïdes aspermes par croisement avec des diploïdes. Les produits de l'hybridation somatique sont très divers du point de vue de leurs génomes nucléaires et cytoplasmiques. De nombreuses fusions ont été réalisées, de sorte qu'il existe actuellement environ 200 combinaisons connues (GROSSER *et al.*, 2000). La première utilisation est la régénération de nouveaux tétraploïdes pour obtenir ensuite des triploïdes aspermes intéressants pour la production de fruits sans pépins. Un autre grand intérêt de l'hybridation somatique est l'obtention directe de triploïdes par fusion d'un protoplaste haploïde et d'un protoplaste diploïde. En ce qui concerne l'amélioration des variétés employées comme porte-greffe, l'hybridation somatique est utile dans la mesure où elle rend possible la combinaison des caractères des deux parents. Des fusions ont aussi été réalisées pour obtenir des portes-greffe combinant les caractères de variétés appartenant à des genres différents. Par ailleurs, l'hybridation somatique permet de générer de nouvelles associations nucléocytoplasmiques au niveau diploïde, soit accidentellement dans les hybridations somatiques symétriques, soit de manière dirigée par fusion asymétrique. Ces cybrides restent relativement rares (environ 30 combinaisons sont connues chez les agrumes). L'évaluation des cybrides permet d'identifier les caractères dépendant du ou des génomes chloroplastiques et mitochondriaux. En annexes, nous présentons nos travaux sur le rôle des interactions nucléocytoplasmiques sur la synthèse des composés d'arôme des hybrides somatiques diploïdes qui ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry* et d'un poster présenté au congrès *International Citrus Congress*, Maroc, 2004.

Ainsi, les programmes de création variétale exploitent la diversité génétique des agrumes et utilisent l'hybridation sexuée et plus récemment l'hybridation somatique pour obtenir de nouvelles variétés. Les possibilités d'hybridation sont très vastes. Il est donc nécessaire de déterminer quels sont les facteurs génétiques contrôlant les caractères d'intérêt au niveau diploïde afin d'orienter les programmes de création variétale.

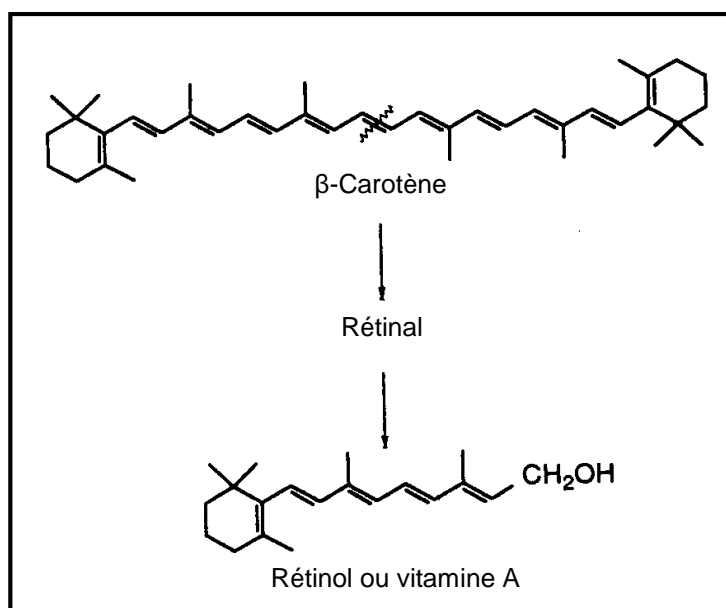
### **I.1.3. Importance des caroténoïdes dans la qualité des agrumes**

Les caroténoïdes constituent l'une des classes les plus importantes de pigments végétaux (les autres grandes classes étant les chlorophylles, les anthocyanes et les bétalaïnes). Les agrumes sont particulièrement riches en caroténoïdes et ils présentent des compositions complexes en ces composés : plus de 100 molécules de caroténoïdes différentes ont été isolées chez les agrumes (GROSS, 1987). Ce sont des constituants majeurs de la qualité organoleptique et nutritionnelle des agrumes.

#### **I.1.3.1.....les caroténoïdes, déterminants majeurs de la couleur des fruits**

Les caroténoïdes sont responsables des couleurs jaune, orange ou rouge des fruits. Par exemple, la  $\beta$ -cryptoxanthine donne une couleur orange vif caractéristique de la clémentine et des mandarines (couleur externe et interne). La composition en caroténoïdes des fruits d'agrumes constitue l'un des premiers facteurs de la qualité des fruits frais et des jus de fruits. Nous précisons que les anthocyanes, molécules de la famille des polyphénols, sont des pigments présents uniquement dans la peau et la pulpe des oranges sanguines. Chez les oranges, les deux anthocyanes majeurs qui donnent une coloration rouge/mauve sont : la cyanidine 3-glucoside et la cyanidine 3-(6"-malonylglucoside). De plus, les oranges sanguines sont aussi riches en caroténoïdes de sorte que la couleur des fruits est déterminée par le mélange de ces deux catégories de pigments. Ainsi, les caroténoïdes sont des déterminants majeurs de la couleur des agrumes.

### I.1.3.2.....Les caroténoïdes, micronutriments participant à diverses fonctions biologiques



**Figure 1.** Comparaison des molécules de β-carotène et de vitamine A.

Les caroténoïdes sont des micronutriments qui ont plusieurs fonctions biologiques. Certains caroténoïdes (essentiellement β-carotène, α-carotène et β-cryptoxanthine) sont des provitamines A (OLSEN, 1989 ; VAN VLIET *et al.*, 1996 ; PARKER, 1996). En effet, au niveau de sa structure, la vitamine A correspond à la molécule de β-carotène coupée en deux, à laquelle est fixée une molécule d'eau en fin de chaîne (Figure 1.). Ainsi, le β-carotène possède la plus grande activité vitamine A car le clivage de cette molécule conduit à la formation de deux molécules de vitamine A ou rétinol tandis que les autres caroténoïdes comme l'α-carotène ou la β-cryptoxanthine ne permettent la formation que d'une seule molécule. A l'inverse des plantes, les animaux sont incapables de synthétiser les caroténoïdes. Leurs caroténoïdes proviennent de leur alimentation. La vitamine A n'est elle présente que dans les aliments d'origine animale. Les animaux peuvent la synthétiser à partir des caroténoïdes ou encore la trouver en consommant des aliments d'origine animale riches en vitamine A. La vitamine A joue un rôle essentiel dans la vision, dans la préservation du tissu épithélial, dans la croissance osseuse et dans la reproduction. D'où l'importance des caroténoïdes dans l'alimentation surtout pour des populations qui consomment peu d'aliments d'origine animale. Dans les pays développés, 25-35% de la vitamine A sont apportés par la consommation de fruits et légumes et donc de caroténoïdes tandis que dans les pays en voie de développement ce chiffre peut atteindre 82% (VAN DEN BERG *et al.*, 2000). L'activité vitamine A des caroténoïdes est exprimée dans les tables alimentaires en rétinol équivalent

(RE) par litre. Cette valeur est déterminée par l'équation suivante :

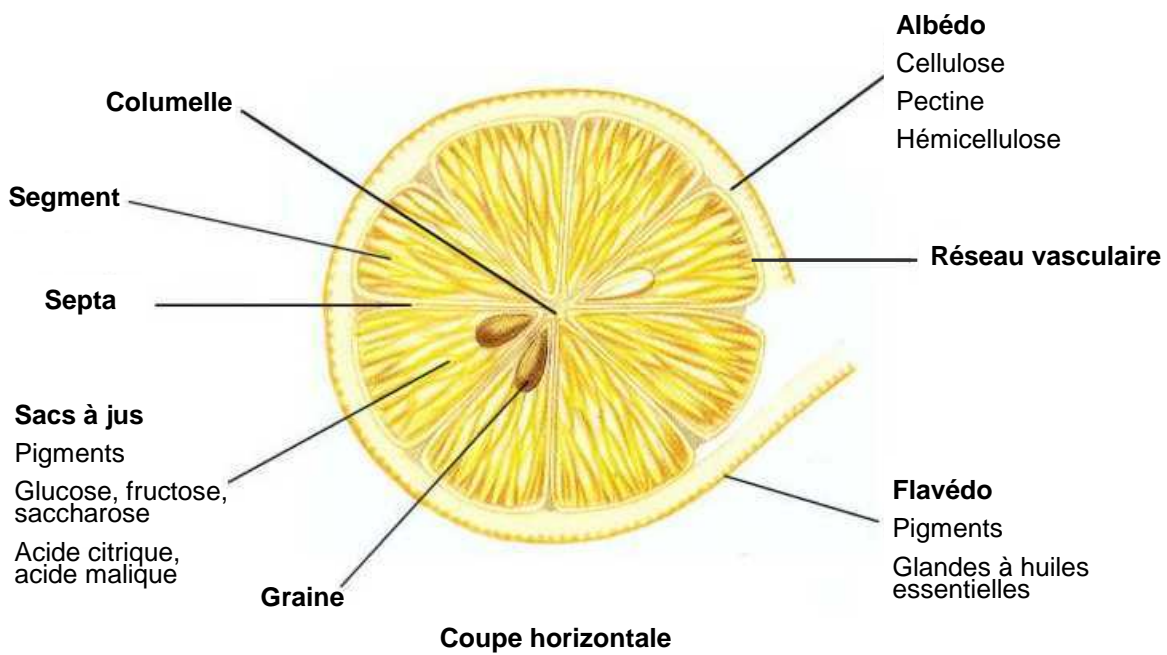
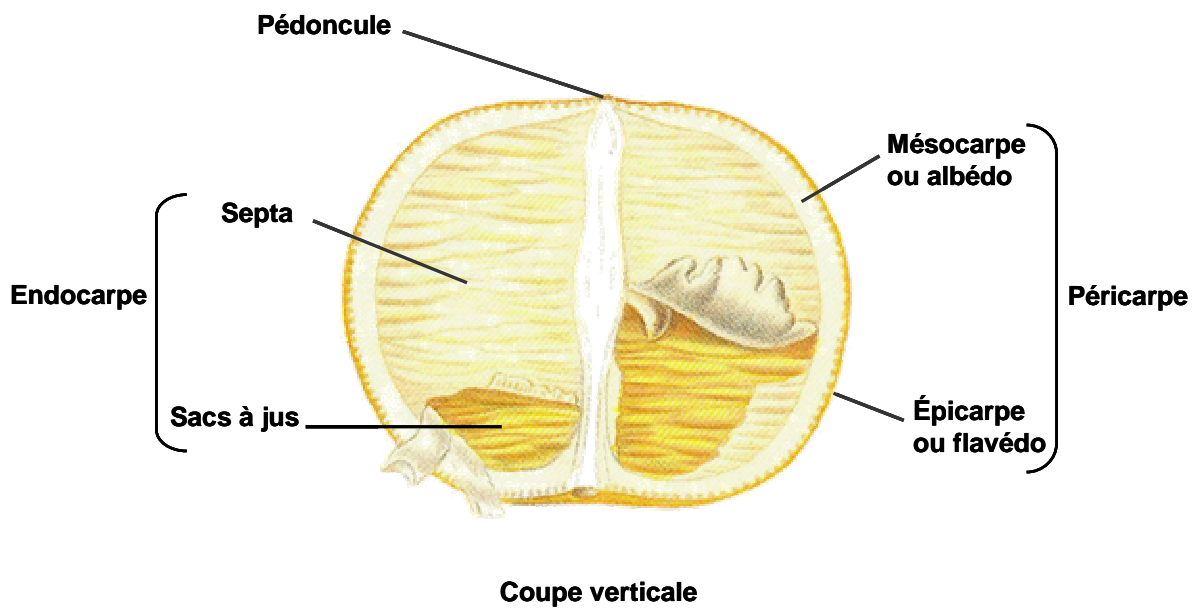
$$\text{RE} = (\mu\text{g } \beta\text{-carotène} / 6) + (\mu\text{g autres caroténoïdes provitamine A} / 12).$$

Les essais *in vitro* effectués dès 1967 ont montré que seule la moitié des molécules de  $\beta$ -carotène sont converties en rétinol (bien que théoriquement une molécule de  $\beta$ -carotène peut être convertie en deux molécules de rétinol) et qu'uniquement un tiers des caroténoïdes est absorbé par l'intestin d'où le chiffre de un sixième du  $\beta$ -carotène ingéré qui est métabolisé en rétinol dans l'équation précédente (FAO/WHO, 1967). Les agrumes et surtout les petits agrumes produits en Corse sont riches en  $\beta$ -cryptoxanthine. Ainsi, les clémentines produites en Corse ont une valeur provitamine A de  $960 \pm 19 \mu\text{g RE}$  par litre (DHUIQUE-MAYER *et al.*, 2005).

Les caroténoïdes sont aussi des antioxydants (GARNER *et al.*, 2000 ; SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2003). C'est grâce à cette propriété que les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de certains cancers et des maladies cardiovasculaires (KRINSKY, 1993 ; YANO, 1999 ; MAYNE, 2003). En effet, les caroténoïdes protègent les structures biologiques des attaques dues aux espèces réactives de l'oxygène. La fonction antioxydante la mieux établie est la capacité à atténuer l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  qui est une espèce active de l'oxygène susceptible de provoquer des mutations. Cette fonction confère aux caroténoïdes (en particuliers au lycopène et au  $\beta$ -carotène) leurs propriétés anticarcinogènes et antimutagènes. Les études concernant les composés biologiquement actifs des jus d'agrumes montrent que le potentiel antioxydant est dû à trois catégories de composés : la vitamine C, les flavonoïdes et les caroténoïdes (GARDNER *et al.*, 2000 ; SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2003). Les jus sur lesquels sont réalisés ces études sont surtout des jus d'oranges et plus rarement des jus de pommelos. La vitamine C est le constituant qui contribue le plus à l'activité antioxydante suivie des flavanones puis des caroténoïdes. Pour GARDNER *et al.* (2000), la vitamine C est responsable de 65 à 100% du potentiel antioxydant du jus d'oranges. Les caroténoïdes y contribuent faiblement. Cependant, ces résultats sont à relativiser sachant que la contribution au pouvoir antioxydant dépend aussi des concentrations des composés. Or pour les caroténoïdes, les concentrations sont fortement liées aux variétés d'agrumes et aussi à la zone géographique de culture. De plus, nous savons que les procédés utilisés pour l'obtention des jus commerciaux abaissent les teneurs en caroténoïdes. Enfin, les caroténoïdes et en particulier les xanthophylles lutéine et zéaxanthine sont des molécules importantes pour la vision et la prévention de la dégénérescence de la macula (région de la rétine) due à l'âge. La pulpe des oranges et des petits agrumes contient ces deux composés.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les teneurs en caroténoïdes des fruits frais des différentes variétés d'agrumes produites dans une zone géographique donnée afin de pouvoir déterminer les qualités nutritionnelles de ces fruits. Ces travaux sont aussi nécessaires pour étudier l'importance du facteur génétique sur la composition en caroténoïdes des fruits d'agrumes. Ces informations permettront de mieux orienter les programmes de création variétale.





**Figure 3.** Différentes parties d'un agrume d'après PRALORAN (1971).



espèces selon les auteurs. Le genre *Poncirus* correspond à une seule espèce à feuilles caduques trifoliées produisant des fruits non comestibles. Cette espèce est souvent utilisée comme porte-greffe. Selon SWINGLE et REECE (1967), le genre *Citrus* désigne 16 espèces dont 8 sont cultivées : *Citrus sinensis* (L.) Obs. (oranger), *Citrus aurantium* L. (bigaradier), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinier), *Citrus paradisi* Macf. (pomelo), *Citrus maxima* (Burm.) (pamplemoussier), *Citrus limon* (L.) Burm. (citronnier), *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (limettier), et *Citrus medica* L. (cédratier). En revanche, selon TANAKA (1977), le genre *Citrus* comprend 162 espèces. Les classifications de Swingle et de Tanaka diffèrent donc. L'exemple des mandarines met en avant ces différences. D'après Swingle, toutes les mandarines (à part *C. indica* et *C. tachibana*) appartiennent à une même espèce *C. reticulata*. D'après Tanaka, les mandarines appartiennent à la section *Acrumen* et sont réparties en 36 espèces. La classification des agrumes est donc complexe. Cette complexité est due à plusieurs facteurs : la diversité morphologique des arbres, la diversité pomologique et organoleptique des fruits (voir Figure 4.), fleurs et feuilles, la compatibilité sexuelle au sein du genre *Citrus* et la polyembryonie. Dans ces conditions, le travail des taxonomistes, fondé sur l'étude des caractères morphologiques, est difficile ce qui explique les divergences de classifications. Dans la suite du document, nous utiliserons la classification de Tanaka.

La structure chromosomique est commune avec  $n = 9$  chromosomes (KRUG, 1943 ; STACE *et al.*, 1993) et les agrumes et les genres apparentés sont majoritairement diploïdes. Seuls quelques polyploïdes naturels ont été identifiés comme *Citrus latifolia* Tan. (var. lime de Tahiti) (OLLITRAULT *et al.*, 2000). Les tétraploïdes seraient des autotétraploïdes provenant du doublement spontané des chromosomes des tissus nucellaires (ESEN et SOOST, 1973). Les tétraploïdes sont caractérisés par une plus faible vigueur ce qui constitue un désavantage sélectif. Les triploïdes proviendraient d'hybridations entre diploïdes et tétraploïdes et entre diploïdes. Dans ce dernier cas, un des gamètes est non réduit. Les triploïdes sont souvent stériles.

Les analyses des génomes nucléaires, chloroplastiques et plus récemment mitochondriaux permettent de mieux comprendre l'histoire de l'évolution des agrumes et d'établir les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Citrus*.

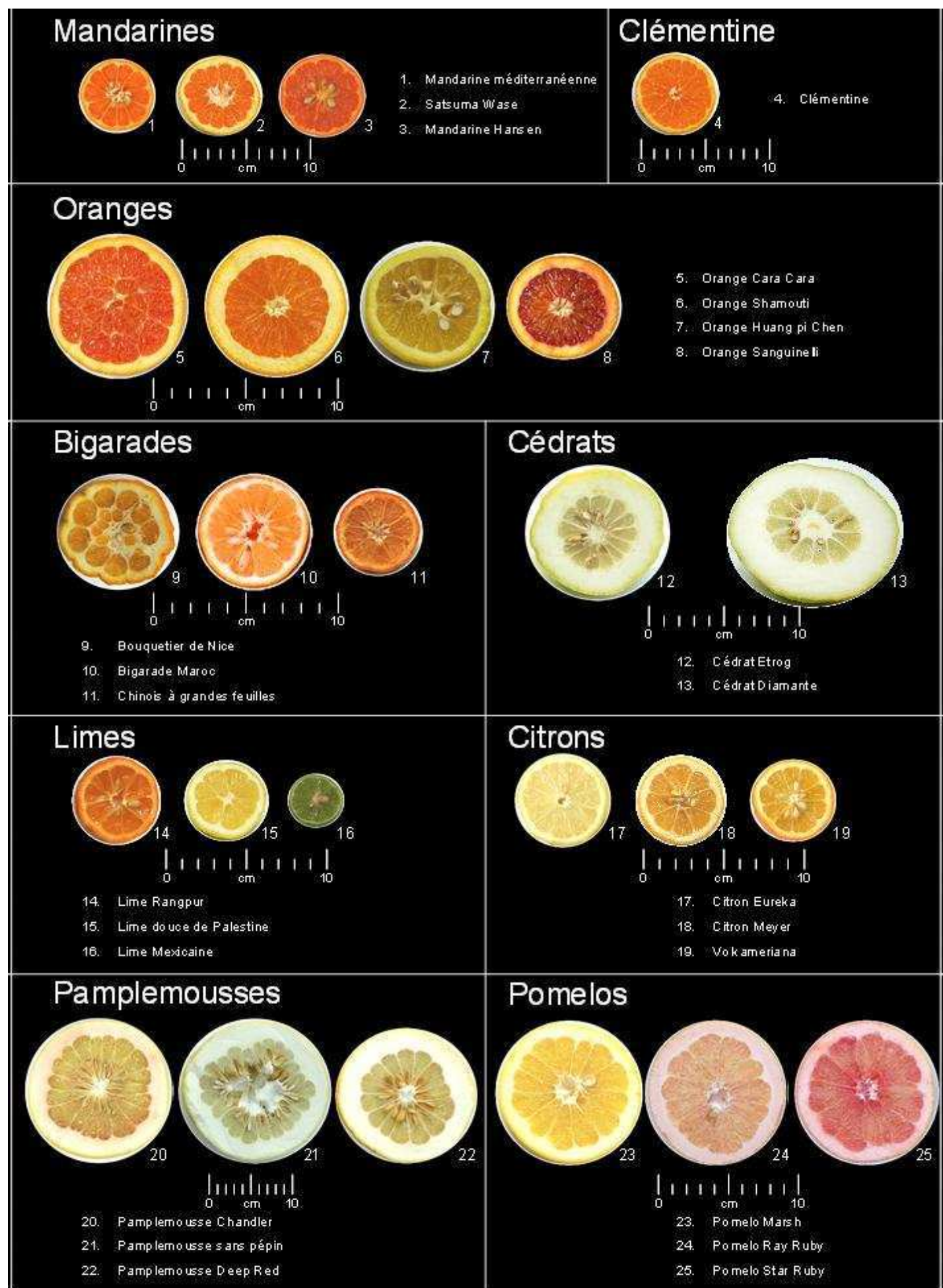


Figure 4. : Diversité pomologique des 25 géotypes analysés

### **I.2.1.2.....Utilisation des marqueurs biochimiques et moléculaires**

La taxonomie numérique et les marqueurs biochimiques et moléculaires ont apporté de nombreuses informations sur l'histoire de l'évolution des agrumes cultivés et les relations phylogénétiques entre les espèces d'agrumes et aussi les genres apparentés. La connaissance de la structuration de la diversité génétique des agrumes est particulièrement importante dans le cadre de la gestion des ressources génétiques, de l'étude des déterminants génétiques des caractères participant à la qualité et dans le raisonnement des programmes de création variétale. Les études utilisant la taxonomie numérique basée sur des descripteurs morphologiques (BARRET et RHODES, 1976 ; OLLITRAULT *et al.*, 1992c) et celles utilisant des marqueurs biochimiques comme les isozymes ou des marqueurs moléculaires comme les RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) et les SSR (*Simple Sequence Repeat*) suggèrent toutes l'existence de trois taxons de base : *Citrus reticulata* (les mandariniers), *Citrus medica* (les cédratiers) et *Citrus maxima* (les pamplemoussiers) (HERRERO *et al.*, 1996 ; HERRERO *et al.*, 1997 ; FEDERICI *et al.*, 1998 ; NICOLSI *et al.*, 2000 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000 ). Ces structurations concordantes indiquent un flux limité de gènes entre les trois taxons de base. La différenciation de ces trois taxons de base serait due à un processus de fondation dans trois zones géographiques et à une évolution allopatrique. En effet, les mandariniers se seraient diversifiés dans une zone couvrant le Vietnam, le sud de la Chine et le Japon, les cédratiers se seraient diversifiés dans le nord-est de l'Inde, et dans les régions voisines de la Birmanie et de la Chine tandis que les pamplemoussiers seraient originaires de l'archipel malais et de l'Indonésie. Les autres espèces cultivées d'agrumes (que nous appellerons espèces secondaires) dériveraient de ces trois taxons de base par des événements de recombinaison sexuée intervenus plus tard entre ces espèces de base mises en contact grâce aux échanges commerciaux et aux migrations humaines.

### **I.2.1.3.....Relations phylogénétiques entre les huit espèces cultivées d'agrumes**

FEDERICI *et al.* (1998) ont étudiés les relations phylogénétiques entre 88 accessions représentant 45 espèces du genre *Citrus* et des genres apparentés en utilisant des marqueurs RFLP et RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) tandis que NICOLSI *et al.* (2000) ont utilisé des marqueurs RAPD, SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) et des marqueurs chloroplastiques pour analyser les relations phylogénétiques entre 36 accessions appartenant au genre *Citrus* et une accession pour chacun des 4 genres apparentés. Plus récemment 24 marqueurs SSR ont été analysés sur 370 accessions de la collection de *Citrus* et

genres apparentés de l'Université de Californie (BARKLEY *et al.*, 2006). Ces travaux permettent de reconstituer l'histoire des huit espèces cultivées d'agrumes et de déterminer les relations entre ces espèces.

Les données sont convergentes. D'après différents auteurs (HERRERO *et al.*, 1996 ; FEDERICI, *et al.*, 1998 ; OLLITRAULT *et al.*, 1999 ; NICOLSI *et al.*, 2000 ; LURO *et al.*, 2001 ; BARKLEY *et al.*, 2006), les orangers (*C. sinensis*) et les bigaradiers (*C. aurantium*) sont proches des mandariniers mais ont introgressé des fragments du génome nucléaire des pamplemoussiers (*C. maxima*). L'utilisation de marqueurs chloroplastiques a montré que le pamplemoussier est intervenu comme parent femelle (GREEN *et al.*, 1996 ; NICOLSI *et al.*, 2000). Les pomelos (*C. paradisi*) sont proches des pamplemoussiers et possèdent certains allèles du groupe des mandariniers / orangers / bigaradiers. Ils seraient issus d'une hybridation entre pamplemoussiers et orangers introduits dans les caraïbes (OLLITRAULT *et al.*, 2000). Les travaux de ces auteurs confirment également que les clémentiniers (*C. clementina*) sont des hybrides entre des mandariniers et des orangers.

Les limettiers et citronniers seraient apparentés aux cédratiers. D'après les études basées sur des caractéristiques morphologiques, les citronniers seraient des hybrides entre des cédratiers et des limettiers (SWINGLE, 1943 ; MALIK *et al.*, 1974) ou des trihybrides entre cédratiers, pamplemoussiers, et une espèce de *Microcitrus* (BARRETT et RHODES, 1976). D'après d'autres auteurs, les bigaradiers seraient aussi parents des citronniers (TORRES *et al.*, 1978 ; HIRAI et KOZAKI, 1981). D'après NICOLSI *et al.* (2000) qui ont intégré les données issues des marqueurs nucléaires et chloroplastiques, les citronniers sont des hybrides entre des cédratiers et des bigaradiers. Le citronnier Volkameriana (*C. limonia* Osbeck) serait un hybride plus complexe entre cédratier, bigaradier et mandarinier. La lime douce de Palestine (*C. limettioides* Tan.) aurait pour parent mâle un cédratier et pour parent femelle un oranger. La lime Rangpur (*C. limonia* Osbeck) serait un hybride entre un cédratier et un mandarinier. Enfin, la lime mexicaine (*Citrus latifolia* Tan.) aurait pour parent mâle un cédratier et pour parent femelle *C. micrantha*.

#### **1.2.1.4.....Origine de la diversification intraspécifique**

Pour les trois taxons de base qui présentent des variétés monoembryonnées, la diversification intraspécifique est due à la fois à des recombinaisons liées à la reproduction sexuée et à des phénomènes de mutation. Pour les espèces secondaires, la diversification intraspécifique est due à des phénomènes de mutation. Ces résultats ont été mis en évidence

par des analyses utilisant par exemple les isozymes et les marqueurs SSR sur les orangers (*Citrus sinensis*), les bigaradiers (*Citrus aurantium*), et les pomelos (*Citrus paradisi*). Ces analyses ont révélé une hétérozygotie modérée chez ces espèces et une absence de polymorphisme intervariétal (HERRERO *et al.*, 1996).

D'après les études isoenzymatiques et les études moléculaires, les cédratiers présentent une diversité allélique très faible due à une forte homozygotie et à un faible polymorphisme entre les cultivars (FEDERICI *et al.*, 1998 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000). Les pamplemoussiers et les mandariniers présentent une grande diversité allélique due à un fort polymorphisme intervariétal (OLLITRAULT *et al.*, 2000). La diversité intercultivar montre que la sexualité, probablement favorisée par la monoembryonie a joué un rôle important dans la diversification, intraspécifique de ces deux espèces. Les citronniers et limettiers sont très hétérozygotes et le polymorphisme intervariétal est faible chez les citronniers mais plus important chez les limettiers (OLLITRAULT *et al.*, 2000). Pour les espèces secondaires comme les orangers, bigaradiers, pomelos et citronniers, il existe une distorsion entre la diversité génétique intervariétale révélée par les marqueurs biochimiques et moléculaires et la diversité morphologique et phénologique (voir Figure 4.). Cette distorsion intervariétale s'explique par un processus de sélection clonale humaine sur des mutations somatiques identifiées au verger (OLLITRAULT *et al.*, 2000).

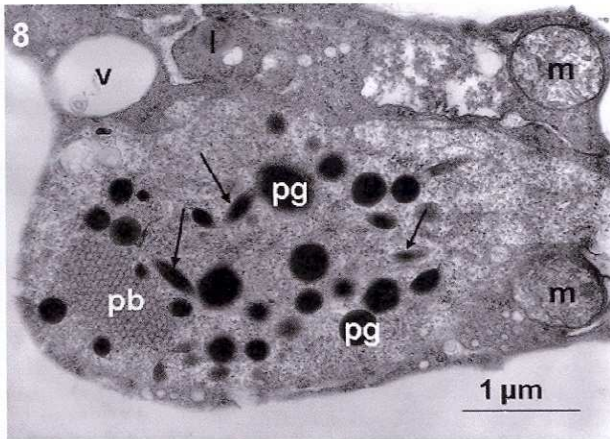
## **I.2.2. Les caroténoïdes chez les plantes supérieures et les agrumes**

### **I.2.2.1.....Localisation, rôle**

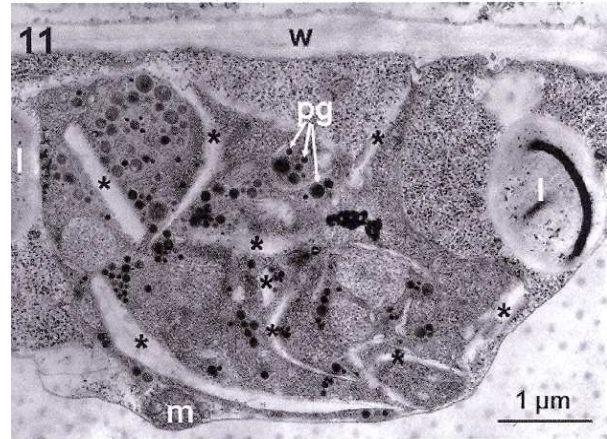
Les caroténoïdes sont synthétisés par les plantes supérieures et certaines algues et bactéries dans des plastes. Dans les tissus photosynthétiques, les caroténoïdes sont synthétisés et stockés dans les chloroplastes tandis que dans les fleurs et les fruits les caroténoïdes produits s'accumulent dans les chromoplastes.

Dans les chloroplastes, les caroténoïdes sont associés aux chlorophylles pour former des complexes chlorophylles / caroténoïdes / protéines au niveau des membranes des thylakoïdes. Dans les photosystèmes, les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène, lutéine, violaxanthine et néoxanthine principalement) ont deux rôles essentiels : ils jouent un rôle important dans la photosynthèse et ils protègent les antennes chlorophylliennes des phénomènes de photooxydation dus à l'état excité de la chlorophylle (DEMMING-ADAMS *et al.*, 1996). Les caroténoïdes (dont le spectre d'absorption est 450 - 570 nm) collectent l'énergie lumineuse et la transfèrent aux chlorophylles qui passent alors à un état excité. Ainsi, une plus large bande du spectre solaire





**A Chromoplaste de mangue avec globules**, en cours de maturation, vu au microscope électronique. pg, plastoglobules; flèches, plastoglobules en formation; pb, corps prolamellaire; l, corps lipidique; m, mitochondries; v, vacuole (VASQUEZ-CAICEDO *et al.*, 2006).



**B Chromoplaste de carotte avec cristaux** vu au microscope électronique. pg, petits plastoglobules; étoiles, cristaux; l, corps lipidique; m, mitochondries; w, membrane plasmique (VASQUEZ-CAICEDO *et al.*, 2006).



**C Chloroplaste de flavedo de kumquat**, dans les premiers stades de développement du fruit, vu au microscope électronique. G, thylakoïdes des granums; m, membranes; pg, plastoglobules (HUYSKENS *et al.*, 1985).

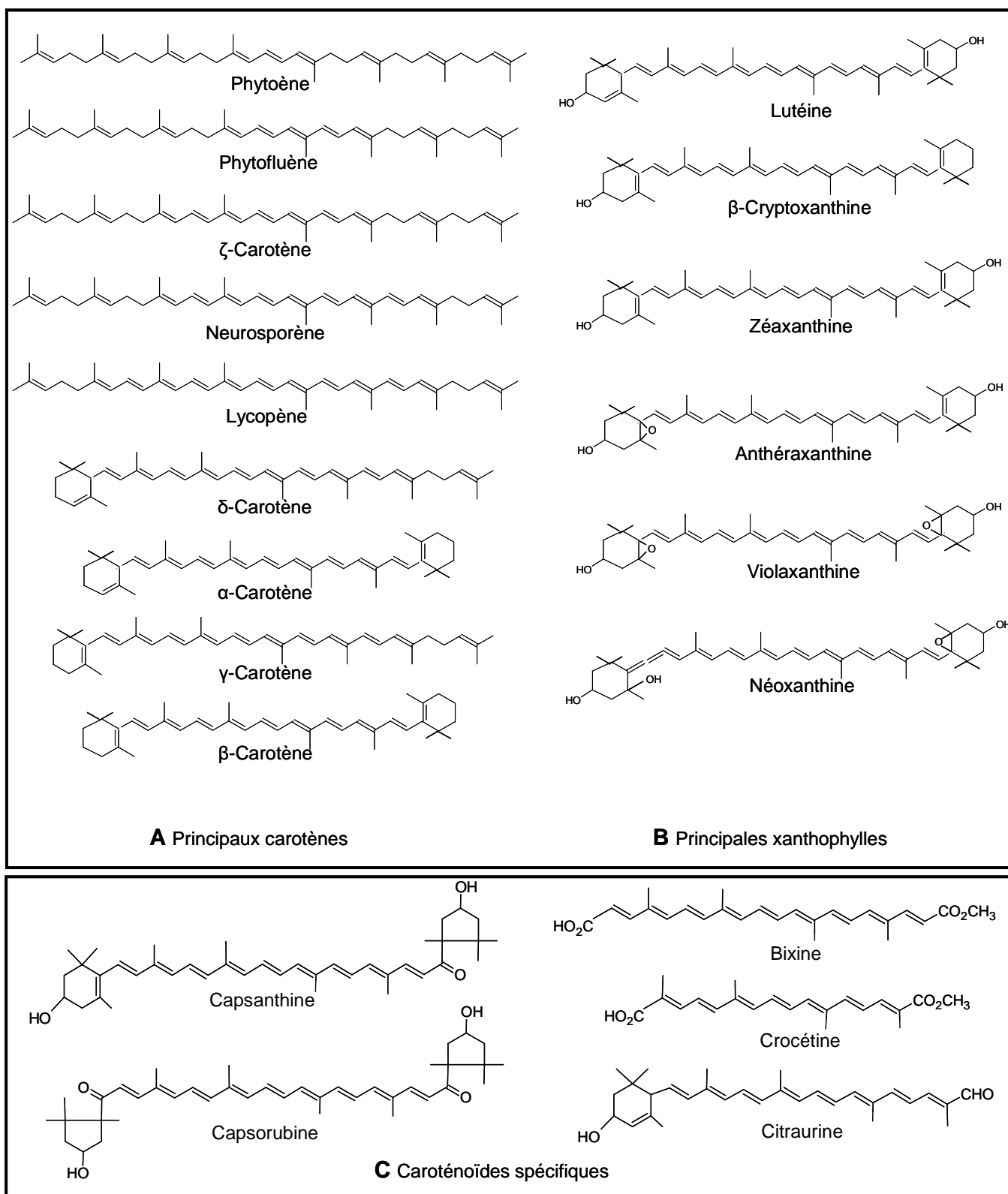


**D Chromoplaste de flavedo de kumquat avec globules**, fruit mûr, vu au microscope électronique. Prolifération de plastoglobules entourés d'une membrane (m) (HUYSKENS *et al.*, 1985).

**Figure 5.** Comparaison des chromoplastes de la mangue (*Mangifera indica*), de la carotte (*Daucus Carota*) et du kumquat (*Fortunella margarita*).

peut être utilisée pour la photosynthèse grâce aux caroténoïdes et aux différentes formes de chlorophylles. Toute seule, la chlorophylle a ne capterait qu'une faible partie de l'énergie lumineuse (spectre d'absorption dans le rouge). Les caroténoïdes jouent aussi le rôle de photoprotecteurs en atténuant l'état excité de la chlorophylle et en évitant ainsi la formation de l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ . Ils permettent aux plantes de s'adapter à des niveaux de lumière variables en évitant les dégradations dues aux rayonnements excessifs (MULLER *et al.*, 2001 ; Robert *et al.*, 2004). Chez les plantes, la violaxanthine joue un rôle essentiel dans la dissipation de l'énergie au niveau des antennes chlorophylliennes (DEMMING-ADAMS *et al.*, 1996).

Les chromoplastes des fleurs et des fruits qui sont des structures spécialisées dans l'accumulation massive des caroténoïdes présentent des formes variées. Dans les premiers stades de développement des fruits, les caroténoïdes sont présents dans les chloroplastes. Au cours de la maturation, les chloroplastes se différencient en chromoplastes avec la dégradation des membranes des thylakoïdes et le développement de structures où s'accumulent les pigments (CAMARA et BRANGEON, 1981 ; HUYSKENS *et al.*, 1985) (voir Figure 5). Les modifications de structures s'accompagnent de changements au niveau biochimique avec la dégradation des chlorophylles et l'accumulation des caroténoïdes et de protéines spécifiques des chromoplastes (CAMARA ET BRANGEON, 1981 ; CHEUNG *et al.*, 1993 ; VISHNEVETSKY *et al.*, 1999). Les chromoplastes des fruits mûrs peuvent être de différents types : avec globules, avec tubules, avec réticulotubules, avec membranes, avec cristaux (SITTE *et al.*, 1980) (Figure 5. A, B et D). La structure des chromoplastes influence les propriétés physiques des caroténoïdes ainsi que leur biodisponibilité. Ainsi, les chromoplastes de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et de la carotte (*Daucus carota*) présentent des structures cristallines dans lesquelles sont stockés des caroténoïdes (carotènes et lycopène) principalement avec une configuration *trans* qui est la configuration la plus stable (FREY-WYSSLING et SCHWEGLER, 1965 ; HARRIS et SPURR, 1969). Ces résultats suggèrent que les structures cristallines des chromoplastes favorisent les configurations *trans*. A l'inverse, les chromoplastes de la mangue contiennent un grand nombre de plastoglobules ce qui est associé à des teneurs importantes en *cis*- $\beta$ -carotène (VASQUEZ-CAICEDO, *et al.*, 2006). La transformation des chloroplastes en chromoplastes qui intervient au cours de la maturation des fruits s'accompagne aussi d'un changement dans les profils en caroténoïdes avec souvent une accumulation massive de xanthophylles. Dans les chromoplastes, les xanthophylles sont souvent estérifiées ce qui augmente leur caractère hydrophobe et facilite leur stockage. Chez les agrumes, au cours de la maturation du fruit, les chloroplastes du flavedo sont transformés en chromoplastes avec la dégradation des thylakoïdes des granums



**Figure 6.** Structure des caroténoïdes. La capsanthine et la capsorubine sont caractéristiques du poivron (*Capsicum annuum*), la bixine est caractéristique du rocou (*Bixa orellana*), la crocétine du safran (*Crocus sativus*) et la citraurine des agrumes.



et l'accumulation des plastoglobules (HUYSKENS *et al.*, 1985) (Figure 5. C et D). La destruction des thylakoïdes et de la chlorophylle intervient avant l'augmentation de la synthèse des caroténoïdes. Les profils en caroténoïdes changent au cours de la maturation. Les chromoplastes du flavedo des kumquats (*Fortunella margarita*) concentrent de grandes quantités de violaxanthine et de  $\beta$ -cryptoxanthine. Ils contiennent aussi de la citraurine qui est un apocarotenal synthétisé uniquement chez les agrumes et qui est caractéristique de la peau de ces derniers (HUYSKENS *et al.*, 1985). Chez le kumquat la pulpe du fruit contient aussi ce composé. Les structures où se concentrent les caroténoïdes jouent un rôle important dans leur accumulation.

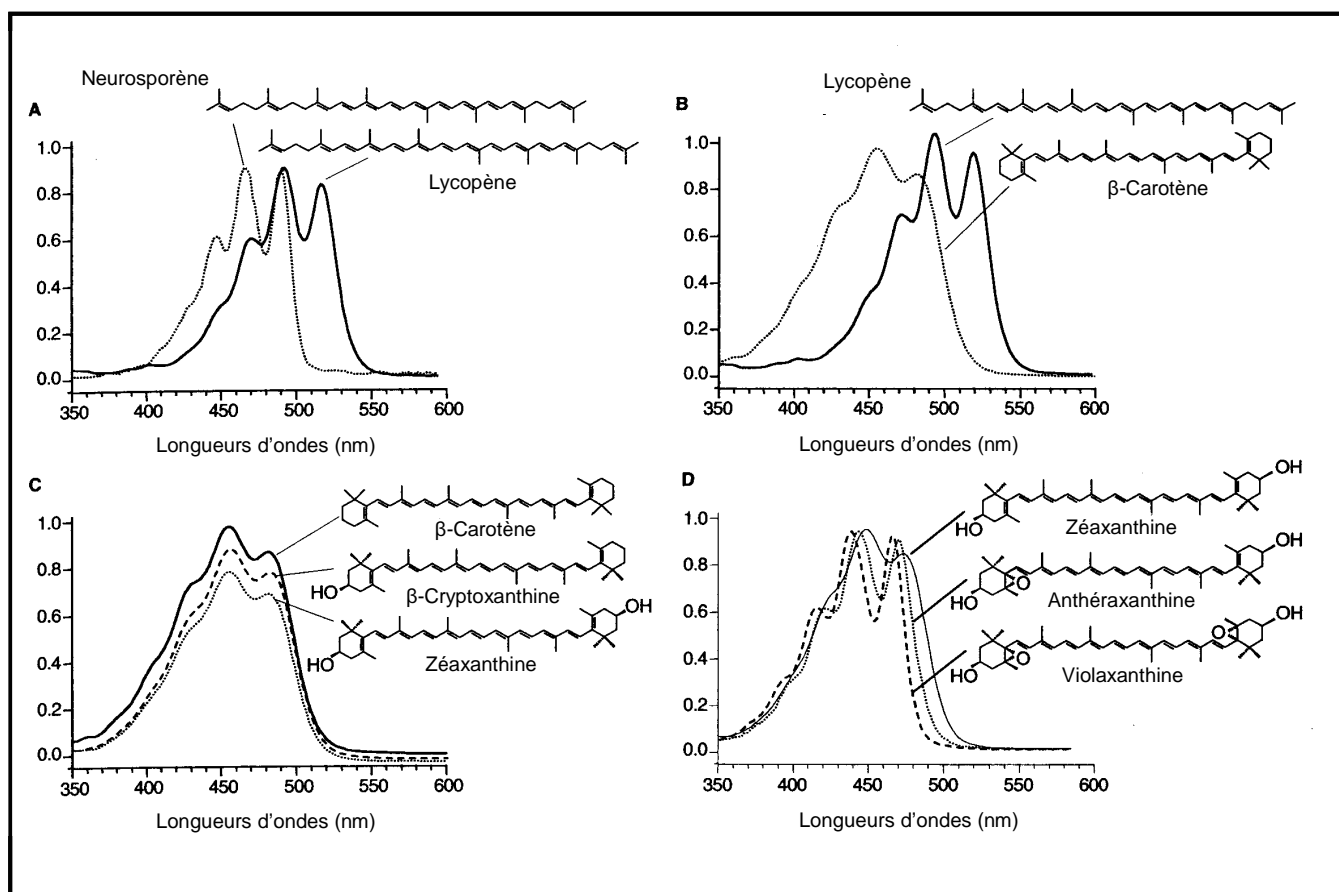
Dans le cas des fleurs et des fruits, la principale fonction des caroténoïdes est d'attirer les insectes pollinisateurs et les animaux responsables de la dissémination des graines (BARTLEY et SCOLNIK, 1995). Il faut aussi noter que les caroténoïdes sont des antioxydants et qu'ils protègent ainsi les plantes des phénomènes d'oxydation dus aux espèces réactives de l'oxygène. De plus, la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes conduit à la formation de l'acide abscissique, hormone de dormance des graines et qui joue aussi un rôle important dans les mécanismes de régulation liés à différents stress.

#### **1.2.2.2.....Propriétés physicochimiques des caroténoïdes, incidence sur les méthodes d'analyse**

Les propriétés physico-chimiques des caroténoïdes nous renseignent sur le rôle qu'ils jouent chez les plantes et les animaux. Ces connaissances sont aussi nécessaires pour réaliser les différentes étapes de l'analyse des caroténoïdes.

Les caroténoïdes sont des tétraterpènes (40 atomes de carbone) qui possèdent un système de doubles liaisons conjuguées ce qui conditionne leurs propriétés physico-chimiques. Les caroténoïdes sont classés en deux catégories : les carotènes (lycopène,  $\beta$ -carotène, etc.) qui ne comportent que des atomes de carbone et d'hydrogène et les xanthophylles ( $\beta$ -cryptoxanthine, violaxanthine, etc.) qui contiennent au moins un groupement hydroxyle (Figure 6.). Certains caroténoïdes présentent des cycles. Enfin, il existe aussi des caroténoïdes qui ont moins de 40 atomes et qui sont appelés apocaroténoïdes (VAN DEN BERG *et al.*, 2000). La plupart du temps, les caroténoïdes sont désignés par des noms triviaux qui ne correspondent pas à la nomenclature systématique. Les doubles liaisons peuvent avoir deux configurations : *cis* ou *trans* (ou Z/E). Il existe ainsi de nombreux stéréoisomères. Chez les plantes, les caroténoïdes s'accumulent souvent sous leur forme *trans* (CHANDLER et SCHWARTZ, 1987).

Cependant, il existe des exceptions comme la mangue qui contient une grande quantité de *cis*- $\beta$ -carotène (VASQUEZ-CAICEDO *et al.*, 2006). Les caroténoïdes sont solubles dans les solvants apolaires. Les carotènes se dissolvent facilement dans l'hexane, l'éther de pétrole et le toluène tandis que pour les xanthophylles, les solvants utilisés sont l'éthanol et le méthanol (BRITTON *et al.*, 1995). Les xanthophylles des plantes sont souvent estérifiées ce qui les rend encore plus hydrophobes. Ces propriétés sont prises en compte dans les méthodes d'extraction des caroténoïdes.



**Figure 7.** Spectres d'absorption dans l'UV et le visible des caroténoïdes. Effets des changements structuraux, (A) variation du nombre de doubles liaisons conjuguées, (B) cyclisation, (C) hydroxylation et (D) époxydation d'après MINGUEZ-MOSQUERA *et al.* (2002).

La propriété physique la plus remarquable est sans doute que les caroténoïdes sont des chromophores : ils absorbent dans l'UV et le visible grâce au système de doubles liaisons conjuguées qui crée un nuage électronique délocalisé pouvant entrer en résonance avec le rayonnement incident. Cette propriété est responsable de la couleur attractive des caroténoïdes (jaune, orange ou rouge), de la capacité des caroténoïdes à collecter l'énergie lumineuse, des spectres d'absorption des caroténoïdes qui sont caractéristiques des différentes molécules et qui servent de base à leur identification et à leur quantification (BRITTON *et al.*, 1995). Les

caroténoïdes ont une couleur perceptible lorsqu'ils possèdent au moins 7 doubles liaisons conjuguées (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). La plupart des caroténoïdes absorbent l'énergie de photons à trois longueurs d'ondes ; les spectres d'absorption des caroténoïdes comportent ainsi trois pics (voir Figure 7.). Plus le nombre de doubles liaisons conjuguées est grand et plus les longueurs d'ondes d'absorption sont grandes. Ainsi, le lycopène qui possède le plus grand nombre de doubles liaisons conjuguées (11) est rouge et son spectre comporte trois pics à 444, 470 et 502 nm. La cyclisation des caroténoïdes entraîne une diminution des longueurs d'ondes absorbées, une diminution de l'absorbance et une diminution de la structure fine du spectre (les pics sont moins bien définis) car les électrons des doubles liaisons des cycles ne sont plus dans le même plan que ceux de la chaîne carbonée. Ainsi, le  $\beta$ -carotène bicyclique qui possède le même nombre de doubles liaisons conjuguées que le lycopène a une couleur orange et absorbe à 425 (pic mal défini), 450 et 477 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Une isomérisation *cis* d'une double liaison entraîne une faible diminution de couleur et l'apparition d'un pic supplémentaire près de la région des UV dans le spectre d'absorption. L'intensité de ce pic est d'autant plus grande que la double liaison *cis* est près du centre de la molécule. Les spectres d'absorption des caroténoïdes dépendent aussi du solvant utilisé pour dissoudre les molécules. Il existe des tableaux donnant les longueurs d'ondes des spectres d'absorption et les coefficients d'extinction molaire des caroténoïdes dans différents solvants (BRITTON *et al.*, 1995). En effet, en solution, les caroténoïdes suivent la loi de Beer-Lambert : l'absorbance de la solution est proportionnelle à la concentration des espèces dissoutes dans cette solution et à la longueur du trajet optique.

**Loi de Beer-Lambert :  $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l C$**

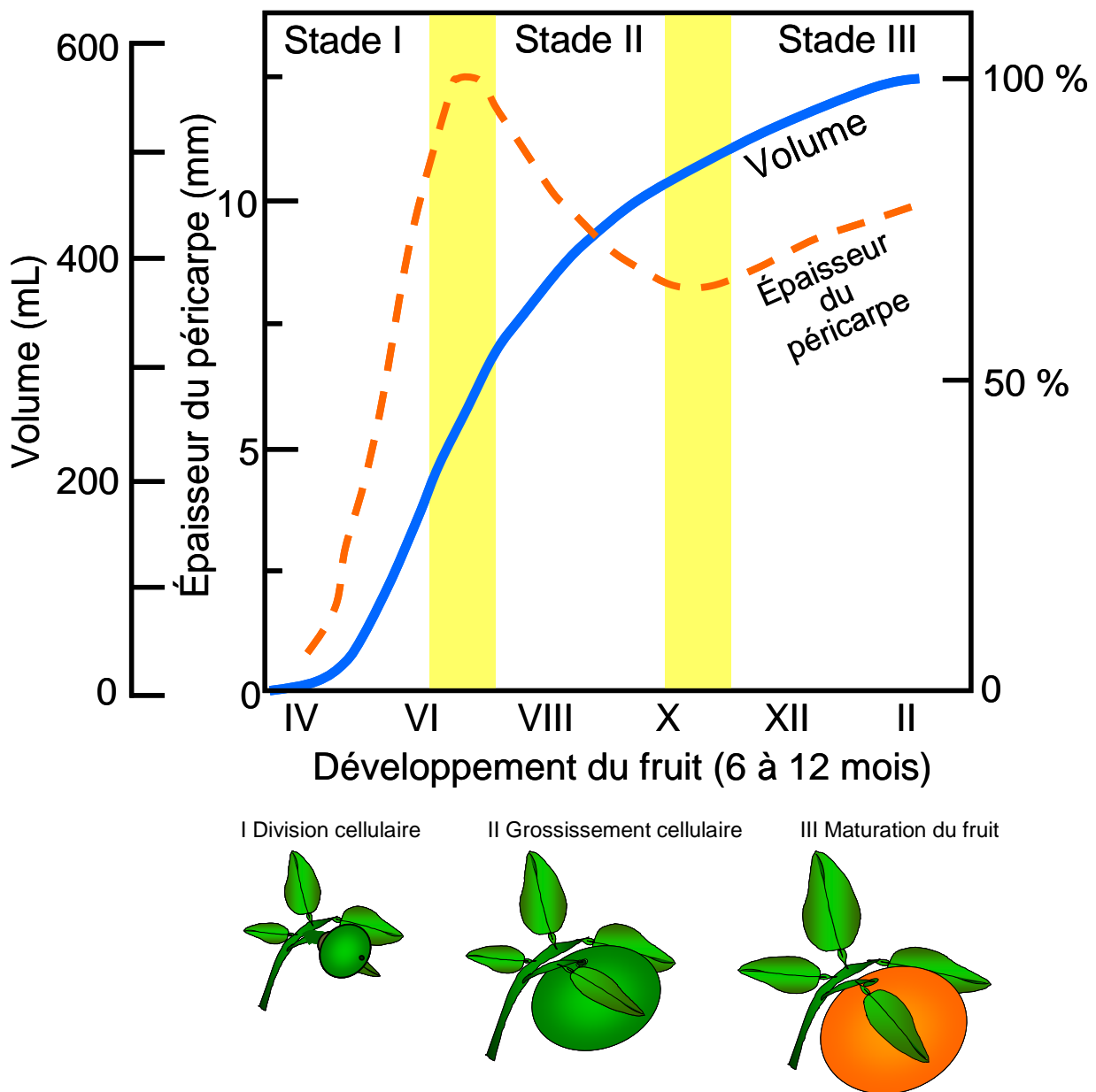
$A_{\lambda}$  est l'absorbance à la longueur d'onde  $\lambda$  ;

$\epsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire (en  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), les tableaux donnent souvent le coefficient d'absorption  $A$  qui correspond à l'absorbance d'une espèce à une solution à 1% à une longueur d'onde  $\lambda$  et avec un trajet optique de 1 cm ;

$l$  est la longueur du trajet optique en cm ;

$C$  est la concentration de l'espèce absorbante (en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Cette propriété est utilisée pour quantifier les caroténoïdes purifiés en solutions qui servent d'étalon. Enfin les propriétés chromatographiques des caroténoïdes dépendent aussi du nombre de doubles liaisons conjuguées, de la présence de cycles ou de groupement hydroxyle. Ainsi, les temps de rétention des composés apportent une première information sur leur structure mais ne permettent pas leur identification.



**Figure 8.** Les trois stades de développement des oranges d'après BAIN (1958) et d'après SPIEGEL-ROY et GOLDSCHMIDT (1996).

En ce qui concerne les propriétés chimiques, les caroténoïdes insaturés réagissent avec les composés électrophiles comme les espèces réactives de l'oxygène (superoxyde, oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl). Ils peuvent aussi subir des isomérisations. La chaleur, la lumière et la présence d'acides provoquent l'isomérisation des formes *trans* (configuration la plus répandue chez les végétaux) en forme *cis* ce qui a pour conséquence une diminution de la couleur et de la valeur provitamine A. L'oxydation est la cause principale de dégradation des caroténoïdes. Elle est facilitée par la disponibilité en oxygène, la présence de lumière, de certaines enzymes, de certains métaux et la peroxydation des lipides qui conduit à la formation d'hydroperoxydes instables. Plusieurs travaux se sont intéressés à l'oxydation du  $\beta$ -carotène par l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène et autres espèces réactives de l'oxygène (KENNEDY et LIEBLER, 1991 ; YAMAUCHI *et al.*, 1993 ; BANDO *et al.*, 2004). D'après STRATTON *et al.* (1993), le  $\beta$ -carotène-5, 8-endoperoxyde est un des produits de l'oxydation du  $\beta$ -carotène par l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ . Ces réactions sont à l'origine du rôle antioxydant des caroténoïdes mais, elles peuvent aussi se produire à toutes les étapes de l'analyse des caroténoïdes. Ces analyses nécessitent ainsi des précautions particulières pour certifier la validité des résultats obtenus. L'oxydation peut entraîner la perte de la couleur et du rôle biologique des caroténoïdes.

### **I.2.2.3.....Compositions en caroténoïdes des agrumes et facteurs de variation**

#### **I.2.2.3.1. Développement des fruits et maturation**

La structure remarquable des fruits caractérise la sous-famille des *Aurantioideae* (voir Figure 3). L'écorce ou péricarpe est formée de l'épicarpe, partie colorée aussi appelée flavédo, et du mésocarpe blanchâtre appelé albédo. Le flavédo contient des glandes à huile essentielle. L'endocarpe est constitué de sacs à jus contenus dans une mince membrane (septa) séparant l'endocarpe en segments ou quartiers.

D'après BAIN (1958), le développement de l'orange Valencia (de l'anthèse à la maturation) comporte trois stades (voir Figure 8). Le stade I correspond à la période de division cellulaire avec la mise en place des différents tissus du fruit. Le stade II est caractérisé par une période de grossissement cellulaire avec un développement rapide de la pulpe. La respiration du fruit (mesurée en mg de  $\text{CO}_2$  par fruit) augmente durant cette phase. A la fin du stade II, le fruit commence à se colorer. Le stade III, avec un grossissement cellulaire qui continue mais moins rapidement qu'au stade II, correspond à la maturation. La maturation s'accompagne de modifications métaboliques : dans la pulpe, les solides dissous

(principalement les sucres) augmentent fortement, l'acidité titrable diminue principalement à cause de la diminution de la concentration en acide citrique (ALBERTINI *et al.*, 2006), les caroténoïdes s'accumulent dans les chromoplastes du flavédo et des sacs à jus. Ainsi, les principaux indicateurs de la maturité des fruits sont : le pourcentage de jus, l'acidité titrable, le degré Brix (pourcentage de solides dissous) et l'index de maturité (SANSON, 1986; DAVIES and ALBRIGO, 1994). Les compositions en caroténoïdes de la pulpe des fruits varient au cours du développement de façon qualitative et quantitative. Dans les premiers stades de développement (stade I et II), la pulpe des fruits est pauvre en caroténoïdes (KATO *et al.*, 2004). La lutéine, caroténoïde abondant dans les chloroplastes, est souvent présente en plus grande quantité dans les premiers stades de développement (stades I et II) que dans les fruits mûres (Stade III) (LEE et CASTLE, 2001 ; KATO *et al.*, 2004). Cependant aux stades I et II, les teneurs en pigment sont faibles et à l'inverse de ce qui se passe dans la peau des fruits il n'y a pas de réelle inversion dans la synthèse avec un passage de la synthèse des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles (lutéine) à la synthèse des  $\beta,\beta$ -xanthophylles ( $\beta$ -cryptoxanthine, zéaxanthine et violaxanthine) (KATO *et al.*, 2004 ; RODRIGO *et al.*, 2004).

Nous devons noter que les agrumes sont des fruits non-climactériques. Les modifications biochimiques qui interviennent au cours de la maturation chez la tomate, fruit climactérique et servant de modèle pour les études sur le développement et la maturation des fruits, sont liées à l'augmentation de la respiration et des quantités d'éthylène. A l'inverse, chez les agrumes, la respiration diminue au cours de la dernière phase de développement et les quantités d'éthylène varient peu (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1993). Dans ce travail nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cette dernière phase de maturation des fruits qui correspond à l'accumulation massive des caroténoïdes dans la pulpe.

#### I.2.2.3.2. Compositions en caroténoïdes dans la pulpe des fruits

Les caroténoïdes s'accumulent dans les chromoplastes du flavédo et aussi dans les chromoplastes des sacs à jus. La peau et la pulpe des fruits ont des compositions complexes en caroténoïdes. Certains auteurs ont isolé jusqu'à 40 composés dans les jus d'oranges (ROUSEFF *et al.*, 1996). La complexité des profils en caroténoïdes (présence de nombreux isomères d'un même caroténoïde) rend l'identification des caroténoïdes de la peau et de la pulpe des agrumes difficile. De plus les compositions en caroténoïdes de la peau et de la pulpe varient en fonction des conditions environnementales, des pratiques culturales, de l'espèce et de la variété et du stade de maturité des fruits. Ainsi, la comparaison des profils chromatographiques en caroténoïdes relevés dans la bibliographie est difficile. Il faut par

**Tableau 1.** Composition en caroténoïdes des agrumes (fruits prélevés à maturité commerciale).

Génotype	Origine géographique	Procédé de transformation	Nombre de caroténoïdes isolés	Concentration en caroténoïdes totaux mg.L <sup>-1a</sup>	Principaux caroténoïdes	Références
C.sinensis cv. Earlygold	Etats-Unis	fruits pressés, presse-agrumes ménager	25	- <sup>b</sup>	<i>cis</i> -violaxanthine 16,1% <sup>c</sup> , anthéroxanthine 10,9%, lutéine 10,4%, $\beta$ -cryptoxanthine 9,1%	LEE <i>et al.</i> , 2001
C. sinensis cv. Cara Cara navel	Floride	fruits pressés, presse-agrumes ménager	29	7,7	lycopène 30%, <i>cis</i> -violaxanthine 9,7%, $\beta$ -cryptoxanthine 6,9%, isolutéine 6,7%	LEE, 2001
C. sinensis, cv. Salustiana	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	violaxanthine 4,76 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -cryptoxanthine 1,50 mg.L <sup>-1</sup> , zéaxanthine 1,20 mg.L <sup>-1</sup> , lutéine 0,60 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. sinensis, cv. Hamlin	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	violaxanthine 5,90 mg.L <sup>-1</sup> , zéaxanthine 1,51 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -cryptoxanthine 1,35 mg.L <sup>-1</sup> , lutéine 0,86 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. sinensis, cv. Maltaise	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	violaxanthine 5,83 mg.L <sup>-1</sup> , zéaxanthine 1,87 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -cryptoxanthine 1,80 mg.L <sup>-1</sup> , lutéine 0,72 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. sinensis, cv. Shamouti	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	violaxanthine 5,81 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -cryptoxanthine 2,76 mg.L <sup>-1</sup> , zéaxanthine 1,34 mg.L <sup>-1</sup> , lutéine 0,50 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. sinensis, cv. Sanguinelli	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	violaxanthine 6,97 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -cryptoxanthine 3,88 mg.L <sup>-1</sup> , zéaxanthine 3,61 mg.L <sup>-1</sup> , lutéine 1,58 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. sinensis, cv. Pera	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	violaxanthine 4,67 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -cryptoxanthine 3,67 mg.L <sup>-1</sup> , zéaxanthine 2,46 mg.L <sup>-1</sup> , lutéine 0,87 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. platymamma, cv. Byungkyool	Corée	pulpe broyée dans l'azote liquide	-	-	$\beta$ -cryptoxanthine 3,2 mg.L <sup>-1</sup>	KIM <i>et al.</i> , 2001
C. erythrosa, cv. Dongjeongkyool	Corée	pulpe broyée dans l'azote liquide	-	-	$\beta$ -cryptoxanthine 4,5 mg.L <sup>-1</sup>	KIM <i>et al.</i> , 2001
C. unshiu, cv. Miyagawa	Corée	pulpe broyée dans l'azote liquide	-	-	$\beta$ -cryptoxanthine 7,8 mg.L <sup>-1</sup>	KIM <i>et al.</i> , 2001
C. paradisi, cv. Flame	Floride	jus reconstitués à partir de concentrés	2	21,1	lycopène 78%	LEE et COATES, 2002
C. unshiu cv. Satsuma	Japon	pulpe broyée dans l'azote liquide	9	25-30	$\beta$ -cryptoxanthine 59,6%, <i>trans</i> -violaxanthine 4,7%, <i>cis</i> -violaxanthine 4,4%	KATO <i>et al.</i> , 2004
C. deliciosa, cv. Willow leaf	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	$\beta$ -cryptoxanthine 10,7 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -carotène 1,60 mg.L <sup>-1</sup> , violaxanthine 1,39 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. clementina	Corse	fruits pressés, presse-agrumes ménager	8	-	$\beta$ -cryptoxanthine 8,63 mg.L <sup>-1</sup> , violaxanthine 2,79 mg.L <sup>-1</sup> , $\beta$ -carotène 1,45 mg.L <sup>-1</sup>	DHUIQUE-MAYER <i>et al.</i> , 2005
C. limon, cv. Lisbonne	Japon	pulpe broyée dans l'azote liquide	-	< 2,5	$\beta$ -cryptoxanthine 0,4 mg.L <sup>-1</sup>	KATO <i>et al.</i> , 2004

<sup>a</sup>correspond à la somme des concentrations en caroténoïdes. <sup>b</sup>non précisé. <sup>c</sup>pourcentage par rapport à la somme des aires des pics.

ailleurs noter que les compositions en caroténoïdes dans la peau et la pulpe des fruits sont différentes quantitativement et qualitativement. Les teneurs en caroténoïdes dans la peau sont supérieures aux teneurs relevées dans la pulpe. Ainsi, chez l'orange Valencia (*Citrus sinensis*) récoltée à maturité, la concentration en caroténoïdes totaux de la peau est environ 5 fois plus élevée que la concentration en caroténoïdes totaux de la pulpe (KATO *et al.*, 2004). La peau des agrumes contient souvent de la citraurine, caroténoïde synthétisé uniquement par les agrumes, alors que ce composé est rarement isolé dans la pulpe (HUYSKENS *et al.*, 1985). Dans le paragraphe suivant, nous détaillons les compositions en caroténoïdes des sacs à jus des fruits.

De nombreux auteurs se sont intéressés aux caroténoïdes des jus d'agrumes souvent afin de déterminer la valeur nutritionnelle de ces derniers (ROUSEFF et RALEY, 1996 ; MOULY *et al.*, 1999 ; PUPIN *et al.*, 1999 ; GOODNER *et al.*, 2001 ; LEE et CASTLE, 2001a ; Lee, 2001b ; LEE et COATES, 2002 ; MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2003 ; CORTES *et al.*, 2004 ; DHUIQUE-MAYER *et al.*, 2005 ; MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005a ; MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2005b). Ces études concernent majoritairement des variétés d'oranges (*C. sinensis*) ou de mandarines (*C. unshiu*, *C. deliciosa*, *C. erythrosa* ou *C. platymamma*) et plus rarement des variétés de pomelos (*C. paradisi*). (Tableaux 1 et 2). L'orange Valencia est la variété la plus étudiée. Ainsi, la pulpe des oranges est riche en xanthophylles et en particuliers en violaxanthine,  $\beta$ -cryptoxanthine, lutéine et zéaxanthine (à part l'orange Cara Cara, mutant naturel d'une orange navel riche en carotènes et xanthophylles). Les proportions en ces composés varient en fonction des variétés d'oranges. Ainsi, d'après LEE et CASTLE (2001), la lutéine est le composé majoritaire chez l'orange Budd Blood tandis que la violaxanthine est le principal caroténoïde chez les oranges Hamlin et Earlygold. DHUIQUE-MAYER *et al.*, (2005) ont analysé les caroténoïdes dans les jus de huit variétés d'oranges provenant de la collection de San Giuliano. La violaxanthine est le composé majoritaire chez ces variétés (teneurs comprises entre 4,65 et 6,97 mg.L<sup>-1</sup>). La  $\beta$ -cryptoxanthine est le deuxième composé le plus abondant (teneurs comprises entre 1,35 et 3,88 mg.L<sup>-1</sup>). Les mandarines contiennent aussi beaucoup de xanthophylles et sont surtout caractérisées par de fortes teneurs en  $\beta$ -cryptoxanthine (Tableau 1). D'après GOODNER *et al.* (2001), les mandarines et leurs hybrides se distinguent des oranges par des teneurs plus élevées en ce composé. De même, DHUIQUE-MAYER *et al.*, (2005) ont mesuré une concentration de  $10,70 \pm 0,45$  mg.L<sup>-1</sup> en  $\beta$ -cryptoxanthine dans la pulpe de la mandarine méditerranéenne (*Citrus deliciosa* Ten.). KIM *et al.* (2001) ont analysé les teneurs en  $\beta$ -cryptoxanthine dans la pulpe de trois variétés de mandarines. Les concentrations varient de 3,2 à 7,8 mg L<sup>-1</sup> en fonction du cultivar. A l'inverse, les pomelos ne contiennent que des



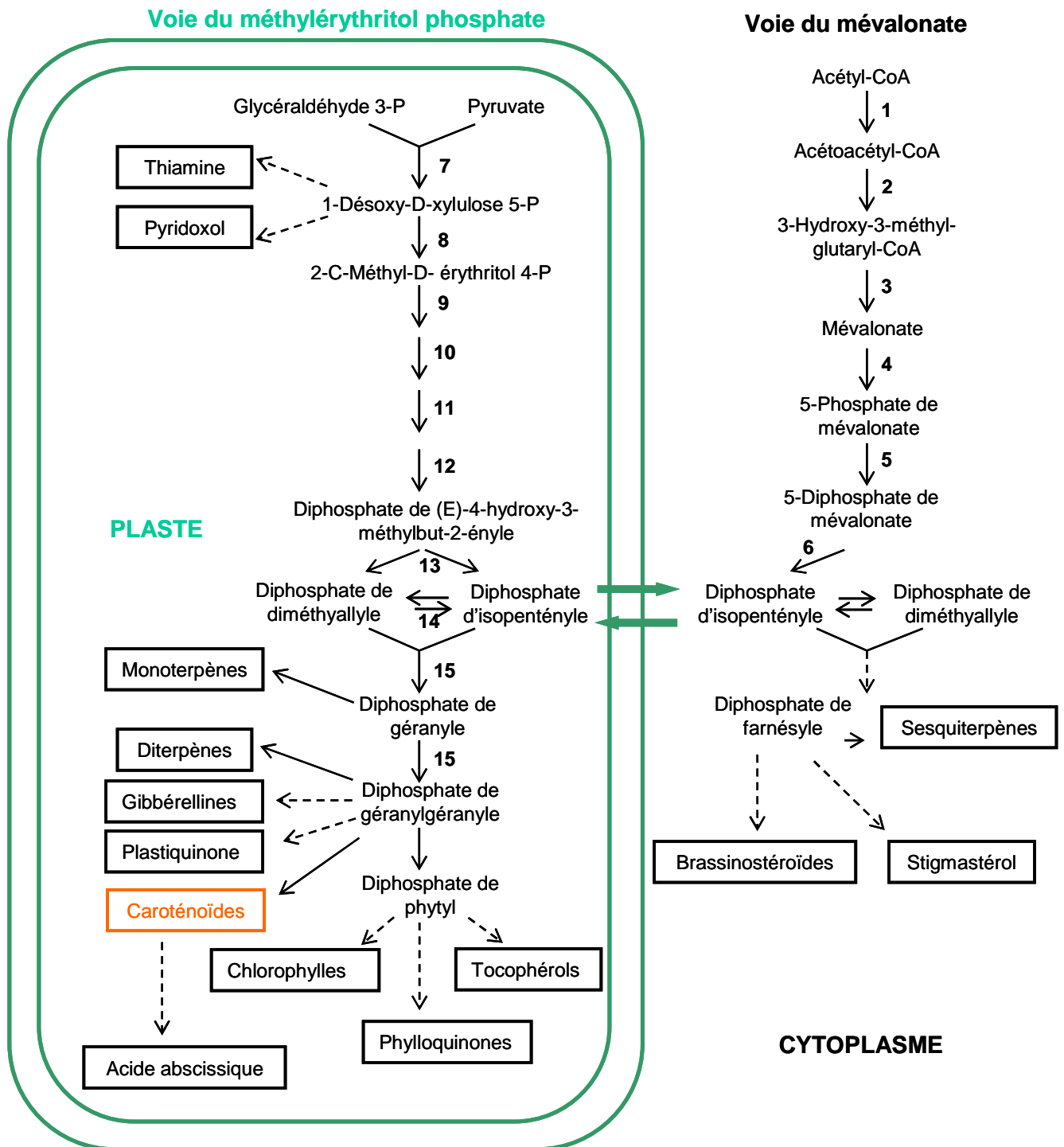
carotènes (phytoène, phytofluène, lycopène et  $\beta$ -carotène). En effet, les deux principaux caroténoïdes des pomelos sont le lycopène et le  $\beta$ -carotène (LEE et COATES, 2002). Les concentrations en ces composés varient en fonction de la variété. Chez certaines variétés, la concentration en lycopène représente 80% de la concentration en caroténoïdes totaux (LEE et COATES, 2002). Ainsi, les variabilités intraspécifiques et surtout interspécifiques sont très marquées en ce qui concerne les compositions en caroténoïdes de la pulpe des fruits. Cependant, peu d'auteurs ont étudié ces variations. Les études portent généralement sur une ou plusieurs variétés d'une même espèce. Seuls KATO *et al.* (2004), à notre connaissance, ont analysé les teneurs en caroténoïdes des fruits appartenant à trois espèces différentes d'agrumes. D'après ces auteurs, la pulpe de la mandarine Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) est riche en  $\beta$ -cryptoxanthine, celle de l'orange Valencia (*Citrus sinensis* Osb.) est riche en violaxanthine et en isomères de la violaxanthine (en particulier la 9-*cis*-violaxanthine) tandis que la pulpe du citron de Lisbonne (*Citrus limon* Burm. f.) est très pauvre en caroténoïdes. Ainsi, nous manquons d'informations sur la variabilité des compositions en caroténoïdes chez les agrumes cultivés et sur la nature des variations intra et interspécifiques. Ces connaissances sont nécessaires pour la détermination de la qualité nutritionnelle des différentes espèces d'agrumes cultivées. De plus une caractérisation de nombreuses espèces et variétés d'agrumes, tous les autres facteurs de variations étant minimisés par ailleurs, constitue la première étape pour l'analyse des déterminants génétiques des compositions en caroténoïdes des agrumes.

**Tableau 2.** Composition en caroténoïdes des oranges Valencia (fruits prélevés à maturité commerciale).

Génotype	Origine géographique	Procédé de transformation	Nombre de caroténoïdes isolés	Concentration en caroténoïdes totaux mg.L <sup>-1a</sup>	Principaux caroténoïdes	Références
C. sinensis cv. Valencia	Espagne	jus pasteurisés	17	21,1	<i>cis</i> -violaxanthine 22,4% <sup>b</sup> , isolutéine+zéaxanthine 20,6%, $\beta$ -cryptoxanthine 10,0%	MOULY <i>et al.</i> , 1999
C. sinensis cv. Valencia	Israël	jus pasteurisés	17	13,9	isolutéine+zéaxanthine 12,2%, $\beta$ -cryptoxanthine 12,7%, <i>cis</i> -violaxanthine 1,6%	MOULY <i>et al.</i> , 1999
C. sinensis cv. Valencia	Bélize	jus pasteurisés	17	4,8	isolutéine+zéaxanthine 33,5%, <i>cis</i> -violaxanthine 18,6%, $\beta$ -cryptoxanthine 6,7%	MOULY <i>et al.</i> , 1999
C. sinensis cv. Valencia	Floride	jus pasteurisés	17	8,2	isolutéine+zéaxanthine 21,1%, $\beta$ -cryptoxanthine 15,5%, <i>cis</i> -violaxanthine 11,1%	MOULY <i>et al.</i> , 1999
C. sinensis cv. Valencia	Cuba	jus pasteurisés	17	6,5	isolutéine+zéaxanthine 25,3%, <i>cis</i> -violaxanthine 16,5%, $\beta$ -cryptoxanthine 11,3%	MOULY <i>et al.</i> , 1999
C. sinensis cv. Valencia	Espagne	jus d'oranges commerciaux	9	-c	lutéine+zéaxanthine 36%, 5,6-époxy lutéine 16%, anthéroxanthine 14%, $\beta$ -cryptoxanthine 12%	MELENDEZ-MARTINEZ <i>et al.</i> , 2003
C. sinensis cv. Valencia	Japon	pulpe broyée dans l'azote liquide	9	15-20	<i>trans</i> -violaxanthine+ <i>cis</i> -violaxanthine 65,4%, $\beta$ -cryptoxanthine 15,1%	KATO <i>et al.</i> , 2004
C. sinensis cv. Valencia	Brésil	jus d'oranges commerciaux	16	12	lutéine 23%, $\beta$ -cryptoxanthine 21%, zéaxanthine 20%	GAMA et SYLOS, 2005

<sup>a</sup>correspond à la somme des concentrations en caroténoïdes. <sup>b</sup>pourcentage par rapport à la somme des aires des pics. <sup>c</sup>non précisé.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la composition en caroténoïdes des agrumes peut être influencée par des facteurs exogènes comme les conditions environnementales et les pratiques culturales. Le facteur environnemental est important. Les oranges Valencia produites en régions méditerranéennes (Espagne et Israël) se distinguent des oranges Valencia cultivées en régions tropicales et subtropicales (Bélize, Cuba et Floride) (MOULY *et al.*, 1999) (Tableau 2). Les oranges produites en régions méditerranéennes sont plus riches en caroténoïdes (concentrations en caroténoïdes totaux de 21,1 et 13,9 mg.L<sup>-1</sup> pour respectivement l'Espagne et Israël) que celles des régions tropicales et subtropicales (concentrations en caroténoïdes totaux de 4,8 ; 6,5 et 8,2 mg.L<sup>-1</sup> pour respectivement Bélize, Cuba et la Floride). Les proportions en caroténoïdes varient également. Par exemple, dans cette étude, les oranges d'Espagne se distinguent des oranges des autres zones par des pourcentages plus élevés en phytoène ; les oranges de Belize diffèrent des oranges des zones méditerranéennes par des pourcentages plus élevés en lutéine et zéaxanthine ; les oranges de Floride et de Cuba ont des pourcentages supérieurs en  $\beta$ -cryptoxanthine par rapport aux oranges des autres zones. En valeur absolue, les oranges des zones méditerranéennes présentent les plus fortes teneurs en composés fortement colorés comme la  $\beta$ -cryptoxanthine.



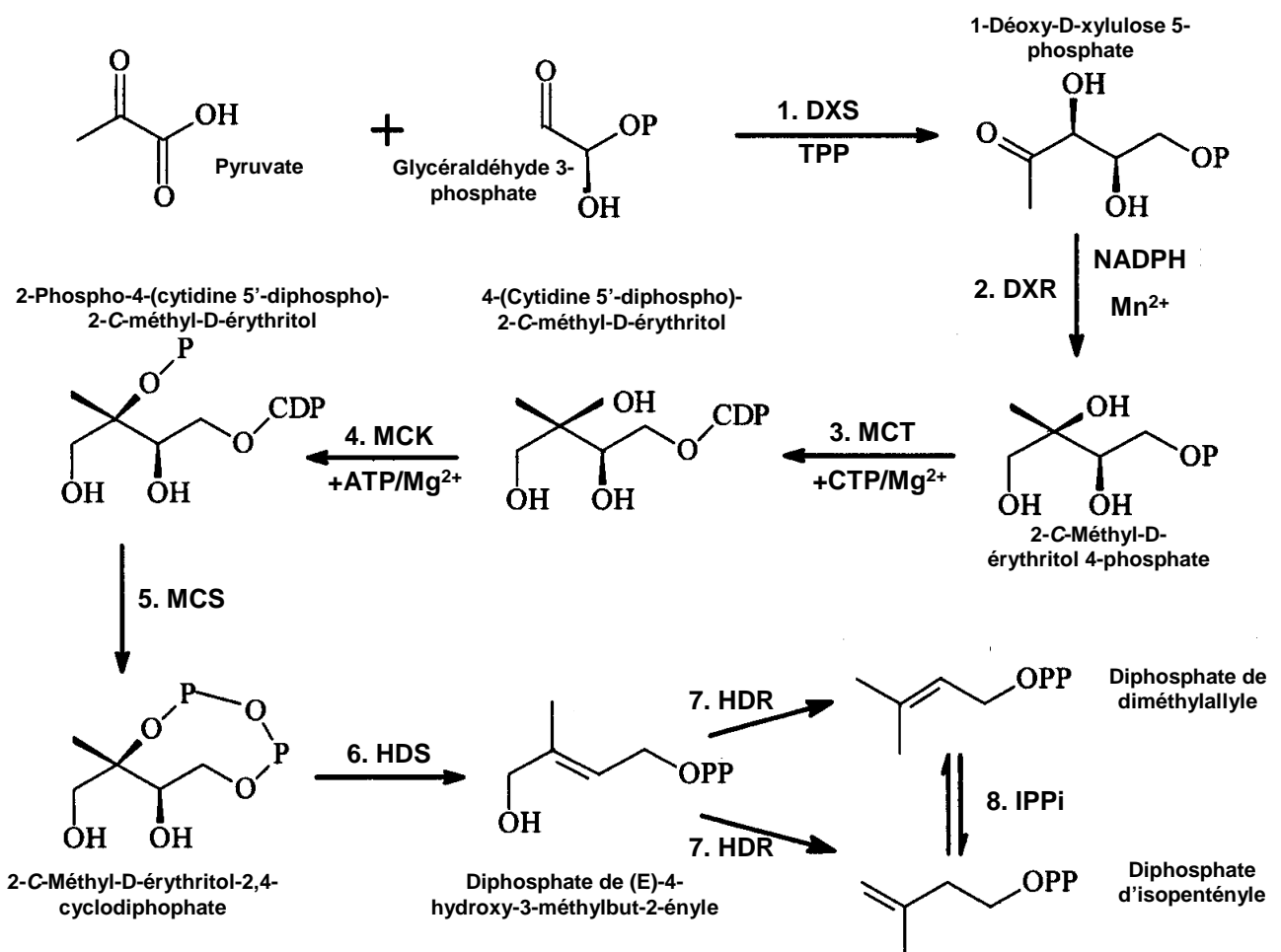
**Figure 9.** Schéma général de la biosynthèse des précurseurs des caroténoïdes. Représentation des interactions entre les différentes voies métaboliques. Les flèches discontinues indiquent que plusieurs étapes ne sont pas représentées.

Ces différentes compositions conditionnent la couleur des fruits et leur qualité nutritionnelle. En zones tropicales, les fruits mûrs gardent une peau verte et leur pulpe est moins colorée que celle des fruits des zones méditerranéennes (PRALORAN, 1971). Les températures et l'intensité du rayonnement doivent jouer un rôle important dans l'accumulation des caroténoïdes. Cependant, il n'existe pas d'études chez les agrumes analysant et modélisant l'impact des facteurs environnementaux sur l'accumulation des caroténoïdes. Les pratiques culturales influencent aussi les teneurs en caroténoïdes des fruits. Les apports d'azote par exemple, ont une incidence sur la couleur des fruits et les teneurs en caroténoïdes. Les hormones comme l'éthylène ou les gibbérellines sont utilisées pour favoriser ou retarder la coloration externe des fruits (IGLESIAS *et al.*, 2001 ; ALOS *et al.*, 2006). Enfin, les procédés post-récoltes et les procédés de transformation modifient les compositions en caroténoïdes et entraînent des isomérisations et oxydations de ces molécules (Tableau 2). Les jus commerciaux obtenus à partir de concentrés présentent des proportions élevées en époxydes : 5,6-époxy lutéine et mutatoxanthine (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2003). Ces composés révèlent que des réactions d'oxydation ont eu lieu au cours de la transformation ou durant le stockage. Ce sont des marqueurs de la qualité des produits.

### **I.2.3. Biosynthèse des caroténoïdes**

#### **I.2.3.1. Biosynthèse des précurseurs**

Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes à 40 atomes de carbone synthétisés dans les plastes par des enzymes codées par des gènes nucléaires. Les isoprénoïdes sont formés à partir de la condensation d'une unité à 5 atomes de carbone, le diphosphate d'isopentényle (IPP), et du diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Chez les plantes supérieures, deux voies de biosynthèses sont à l'origine de l'IPP et du DMAPP : la voie du mévalonate (MVA) qui se déroule dans le cytoplasme (MCGARVEY et CROTEAU, 1995) et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) localisée dans les plastes (RHOMER *et al.*, 1993 ; LICHTENTHALER *et al.*, 1997 ; LICHTENTHALER, 1999 ; RHOMER, 1999 ; RODRIGUEZ-CONCEPTION et BORONAT, 2002). Les précurseurs des caroténoïdes (IPP et DMAPP) proviennent principalement de la deuxième voie de biosynthèse, celle du MEP, découverte récemment (RODRIGUEZ-CONCEPTION et BORONAT, 2002). Cependant plusieurs études ont montré l'existence d'échanges de métabolites entre ces deux voies par l'utilisation de substrats marqués au  $^{14}\text{C}$  ou d'inhibiteurs spécifiques (ALBRECHT et SANDMANN, 1994 ; KASAHARA *et al.*, 2002 ; LAULE *et al.*, 2003) (Figure 9.).



Les enzymes sont: **1. DXS**, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthétase; **2. DXR**, 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase; **3. MCT**, 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl-transférase; **4. MCK**, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase; **5. MCS**, 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthétase; **6. HDS**, diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle synthétase; **7. HDR**, diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle réductase; **8. IPPi**, diphosphate d'isopentényle isomérase; .

**Figure 10.** Synthèse du diphosphate d'isopentényle par la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).

## I.2.3.1.1. La voie du mévalonate

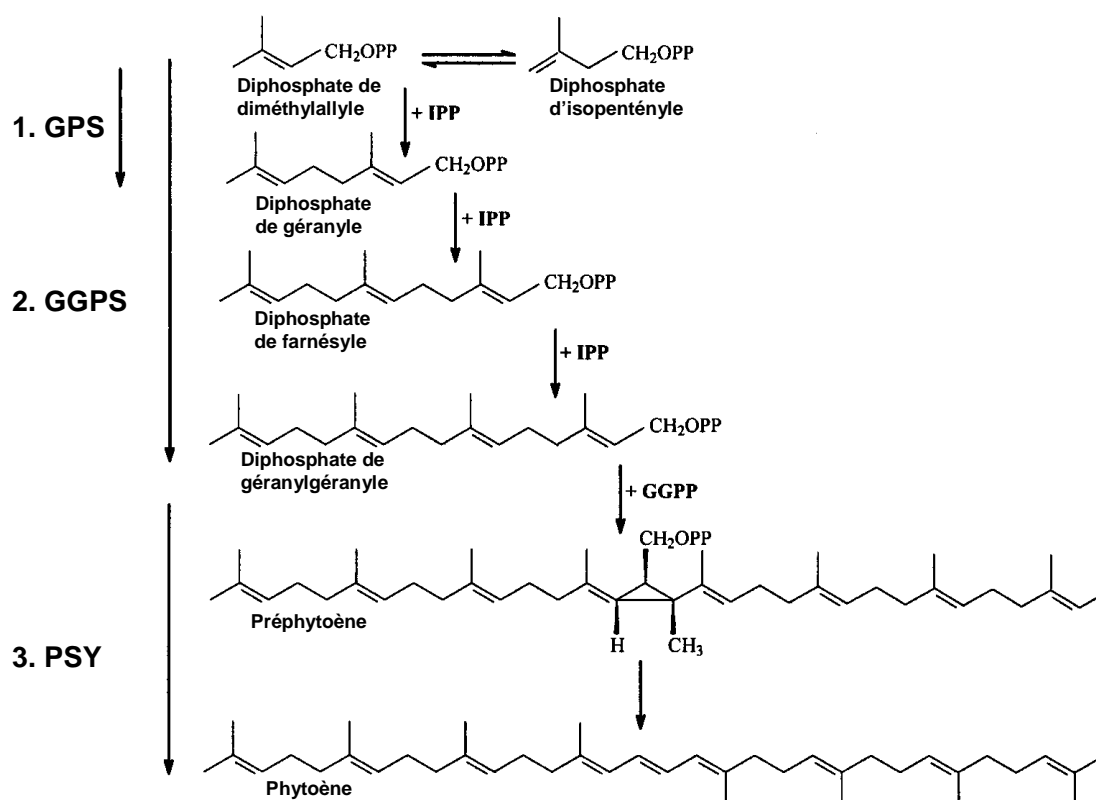
L'IPP est synthétisé par la voie du mévalonate (MVA) à partir de trois molécules d'acétyl CoA (Figure 9.). Le MVA est obtenu par condensation de molécules d'acétyl-CoA avec la formation d'un premier intermédiaire, l'acétoacétyl-CoA, grâce à l'action de l'acétoacétyl CoA thiolase puis d'un deuxième intermédiaire, le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMGCoA), grâce à une synthétase (POTTY, 1969). Le HMGCoA est converti en MVA par une réaction de réduction catalysée par la HMGCoA réductase en présence de NADPH. La phosphorylation enzymatique du MVA par l'ATP conduit à la formation de l'IPP. Le MVA est converti en phosphate de mévalonate (MVAP) grâce à une MVA kinase et le MVAP est converti en diphosphate de mévalonate (MVAPP) par une phosphomévalonate kinase. Enfin, l'IPP est obtenu à partir du MVAPP par décarboxylation grâce à l'action de la diphosphomévalonate décarboxylase (POTTY et BRUEMMER, 1970 a et b). Selon ces derniers auteurs, le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) est obtenu à partir de l'IPP par isomérisation en présence d'IPP isomérase. La condensation de l'IPP et du DMAPP conduit à la formation des diphosphates de prénylallyle (MCGARVEY et CROTEAU 1995). La voie de l'acide mévalonique synthétise ainsi les précurseurs des stérols, ubiquinone, et sesquiterpènes comme certains composés d'arôme.

## I.2.3.1.2. La voie du méthylérythritol phosphate (MEP)

La première étape de la voie du méthylérythritol phosphate consiste en la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate (DX5P) par la réaction du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP), précurseurs issus du métabolisme du glucose. Cette réaction est catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthétase (DXPS ou DXS) (LOIS *et al.*, 2000) (Figures 9. et 10.). La DXS catalyse une condensation de l'hydroxyéthylthiamine, issue de la décarboxylation du pyruvate, sur le groupement carbonyle C-1 du D-glycéraldéhyde 3-phosphate (Figure 10.). Le DX5P conduit à la formation du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) par l'action de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate isoméro-réductase (DXR) en présence de NADPH et  $Mn^{2+}$ . La DXR catalyse ainsi le réarrangement intramoléculaire du DX5P et la réduction de l'aldéhyde intermédiaire alors formé (Figure 10.). Le MEP est converti en IPP et DMAPP via quatre intermédiaires : 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-ME), 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol (CDP-MEP), 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate (ME-cPP) et diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle (HMBPP). Les enzymes responsables de la formation de ces produits sont la 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyl-transférase

(MCT), la 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (CMK), la 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthétase (MCS) et la diphosphate de (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle synthétase (HDS). La dernière étape conduit à la formation de l'IPP d'une part et du DMAPP d'autre part. La HMBPP réductase (HDR) aussi appelée IPP/DMAPP synthétase convertit le HMBPP en un mélange de IPP et DMAPP 5 : 1 (Figure 10.). Les gènes de la voie du MEP ont été récemment identifiés chez les bactéries et chez les plantes supérieures (EISENREICH *et al.*, 2001 ; RODRIGUEZ-CONCEPTION et BORONAT, 2002 ; BOTELLA-PAVIA *et al.*, 2004 ; EISENREICH *et al.*, 2004). Les gènes sont nucléaires et les enzymes sont situées dans les plastes. L'ADNc codant pour la DXS a été cloné et séquencé chez différentes plantes dont *Arabidopsis thaliana* (MANDEL *et al.*, 1996), la menthe (LANGE *et al.*, 1998), le poivron (*Capsicum annuum*) (BOUVIER *et al.*, 1998) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (LOIS *et al.*, 2000). L'ADCNc séquencé chez la tomate (*LeDxs1*) code pour une enzyme de masse moléculaire 77.6 kDa (MANDEL, *et al.*, 1996 ; LANGE *et al.*, 1998 ; LOIS *et al.*, 2000). Cependant, nous manquons encore d'informations sur la régulation de cette voie de biosynthèse et sur le rôle des différentes enzymes dans la régulation des flux conduisant à la synthèse de l'IPP et DMAPP en quantités suffisantes pour la synthèse des différents isoprénoïdes plastidiques comme les caroténoïdes. D'après les travaux de LOIS *et al.* (2000) et de BOTELLA-PAVIA *et al.* (2004), des teneurs plus élevées en enzymes de la voie du MEP : DXS et HDR augmentent la synthèse des précurseurs utilisés par les caroténoïdes et aussi les concentrations de ces derniers. LOIS *et al.*, (2000) ont étudié l'expression du gène codant pour la DXS, première enzyme de la voie du MEP. Ces auteurs ont montré que l'expression de ce gène chez la tomate est corrélée à l'accumulation des caroténoïdes. De plus, des tomates exprimant en grande quantité un gène bactérien codant pour la DXS ont des fruits plus riches en caroténoïdes que les plantes non modifiées. Les teneurs en  $\beta$ -carotène sont 1,4 fois plus élevées tandis que les concentrations en lycopène sont 1,6 fois plus importantes dans les fruits des plants transformés. A l'inverse, les teneurs en caroténoïdes des fruits ne sont pas modifiées chez des plants surexprimant les gènes codant pour la voie du MVA (ENFISSI *et al.*, 2005). Cependant, les études concernant la DXR et HMBPP ont montré que ces enzymes ne semblent pas contrôler des étapes limitantes pour la synthèse des caroténoïdes (LOIS *et al.*, 2000 ; RODRIGUEZ-CONCEPTION *et al.*, 2001 ; RODRIGUEZ-CONCEPTION *et al.*, 2003). Ainsi, la voie du MEP participe au contrôle de la synthèse des caroténoïdes mais le rôle de chacune des étapes reste à déterminer ainsi que les différents mécanismes de régulation.

## I.2.3.1.3. Du diphosphate d'isopentényle au diphosphate de géranylgéranyle

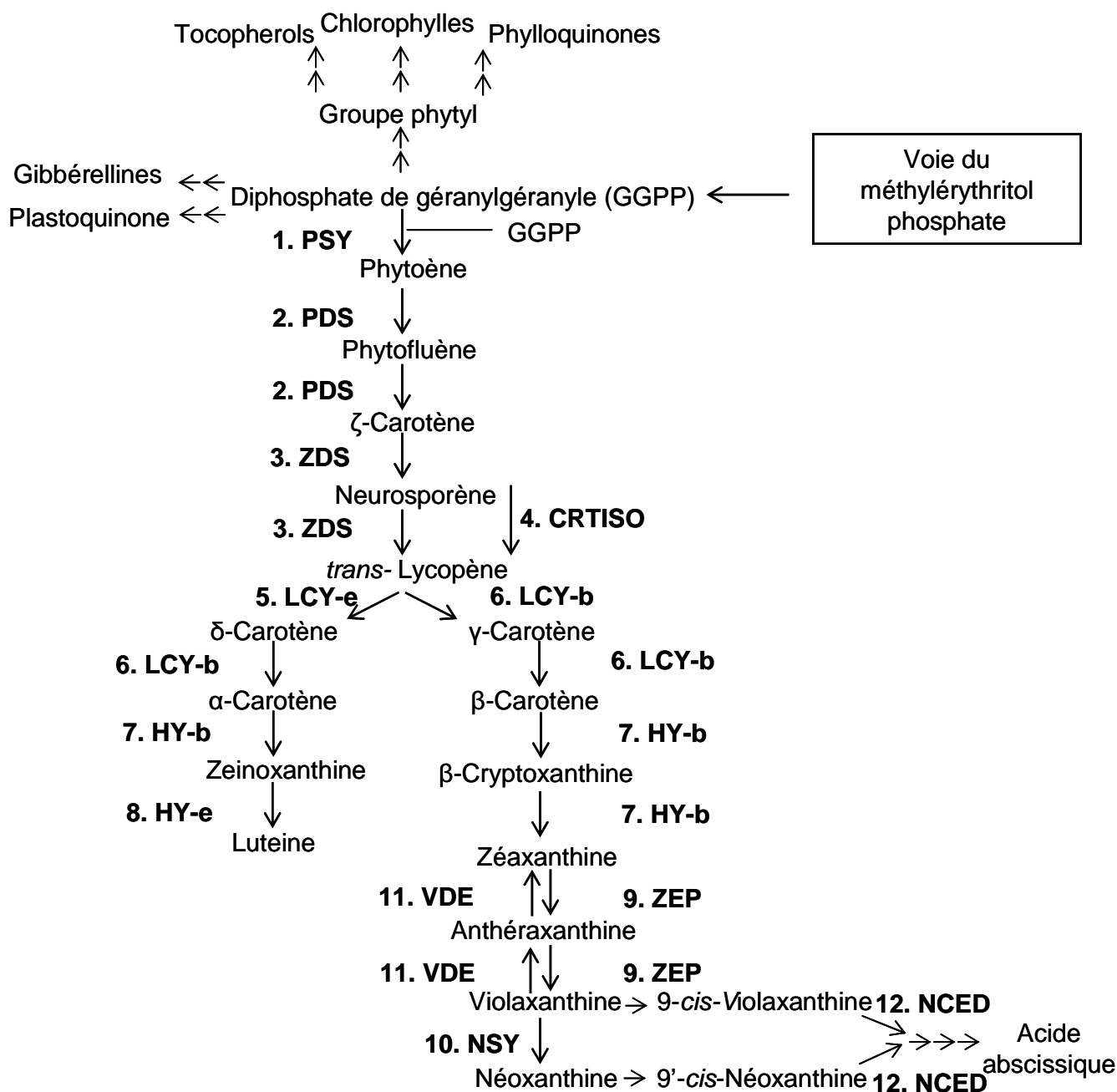


Les enzymes sont: 1. **GPS**, diphosphate de géranyle synthétase; 2. **GGPS**, diphosphate de géranylgéranyle synthétase; 3. **PSY**, phytoène synthétase.

**Figure 11.** Synthèse du phytoène à partir du diphosphate d'isopentényle.

En aval de l'IPP, la polymérisation des unités isopréniques permet la formation des diphosphates de prénylallyle, que l'IPP ait une origine cytosolique ou chloroplastique. L'IPP s'isomérisé en diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). Cette réaction réversible est catalysée par l'IPP isomérase en présence de  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (Figures 9. et 11.). Le gène codant pour cette enzyme a été isolé et séquencé chez différentes plantes dont *Arabidopsis thaliana*. Ensuite, une nouvelle molécule d'IPP se combine au DMAPP pour donner le diphosphate de géranyle (GPP) en  $C_{10}$ . Une addition similaire d'IPP conduit au diphosphate de farnésyle (FPP) en  $C_{15}$  puis au diphosphate de géranylgéranyle (GGPP) en  $C_{20}$ . La GGPP synthétase (GGPS) responsable de la formation du GGPP à partir de l'IPP et DMAPP est active en présence de  $Mg^{2+}$ . Le gène codant pour cette enzyme a également été isolé et séquencé chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et *Arabidopsis thaliana*. Chez *Arabidopsis*, ce gène est présent en 12 copies. Sur ces 12 gènes, 9 codent pour des enzymes adressées aux plastides (OKADA *et al.*, 2000 ; LANGE et GHASSEMIAN, 2003). Certaines





**Figure 12.** Schéma général de la synthèse et du catabolisme des caroténoïdes chez les agrumes.

GGPP synthétases seraient spécifiques des caroténoïdes (BOTELLA-PAVIA et RODRIGUEZ-CONCEPTION, 2006). Nous devons également noter que le GGPP produit dans les plastes est le précurseur des caroténoïdes mais aussi des gibbérellines, de la chaîne phytol des chlorophylles, des phylloquinones et des tocophérols (Figures 9. et 11.). Il existe des interactions entre les différentes voies de biosynthèse pour l'utilisation du GGPP. Une compétition entre les différentes voies de biosynthèse a été mise en évidence par ALOS *et al.* (2006). D'après ces auteurs, le niveau d'expression le plus élevé du gène codant pour la DXS correspond au maximum de la somme des concentrations en chlorophylles et caroténoïdes dans le flavédo des fruits d'agrumes. Les travaux sur la tomate ont montré que les tomates transformées avec le gène *PsyI* (première étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes) codant pour la phytoène synthétase (PSY) spécifique des chromoplastes accumulent plus de caroténoïdes dans les tissus chlorophylliens et les jeunes fruits. Cependant, les plants sont plus petits et présentent des concentrations réduites en chlorophylles dans les jeunes feuilles. Ce phénotype s'explique par l'utilisation massive de GGPP pour la synthèse des caroténoïdes due à la présence d'une grande quantité d'ARNm de *PsyI* et à la diminution consécutive du GGPP pour les autres voies de biosynthèse comme celle de la synthèse des gibbérellines et de la chaîne phytol des chlorophylles (FRAY et GRIERSON, 1993 ; FRAY *et al.*, 1995).

### **1.2.3.2.....Gènes et enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes**

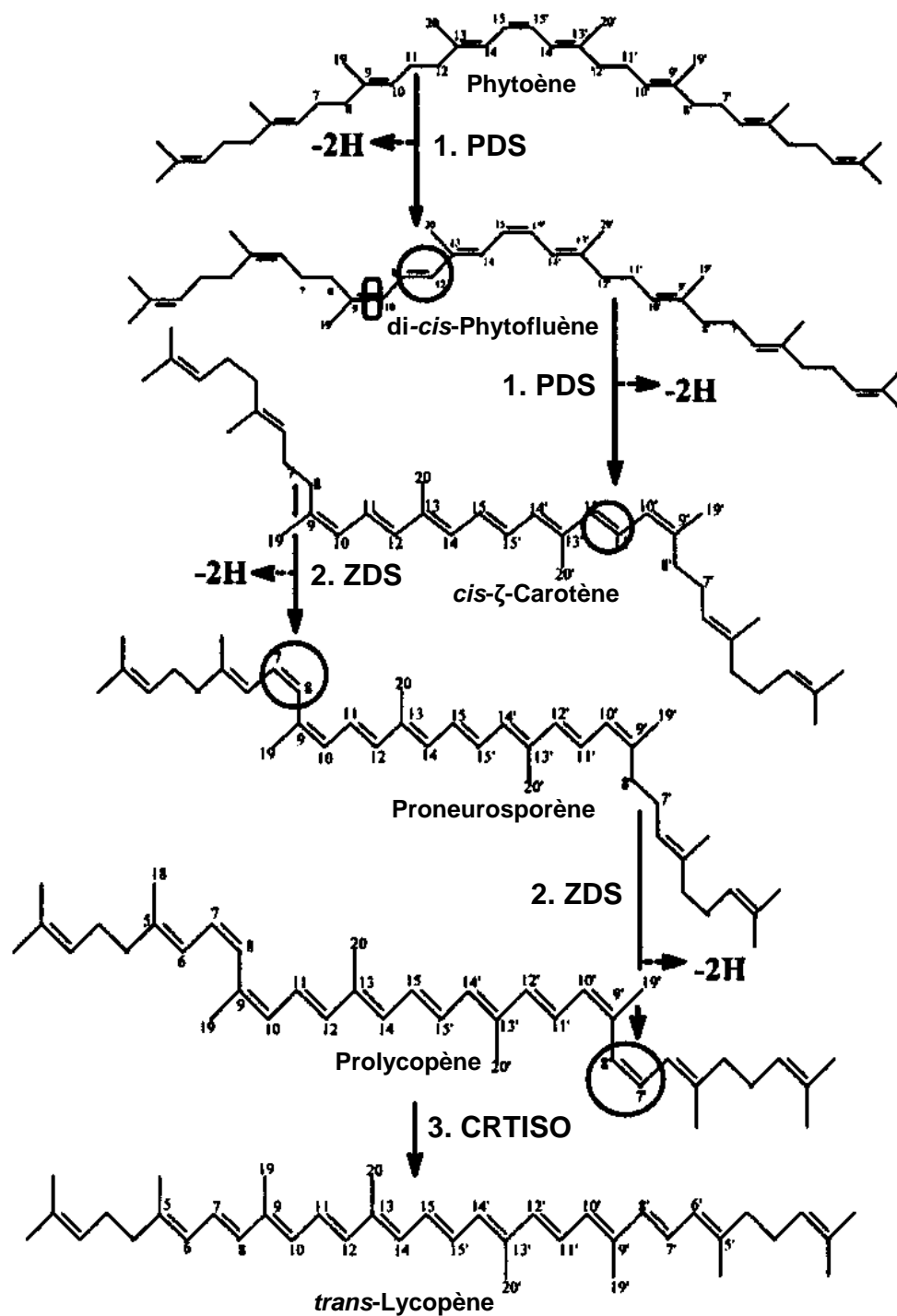
La voie de biosynthèse des caroténoïdes, qui se déroule dans les plastes, et les gènes codant pour les enzymes de cette voie sont connus (CUNNINGHAM et GANTT, 1998 ; HIRSCHBERG, 2001 ; FRASER et BRAMLEY, 2004 ; INOUE, 2004). Les enzymes ont été identifiées et caractérisées au niveau moléculaire à partir de l'étude de certaines plantes modèles comme *Arabidopsis thaliana*, la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le poivron (*Capsicum annuum*) et *Narcissus* et la transformation de bactéries (*Escherichia coli*) par l'introduction des gènes de synthèse des caroténoïdes issus des bactéries *Erwinia herbicola* et *Rhodobacter capsulatus* (CUNNINGHAM *et al.*, 1993). Le diphosphate de géranylgéranyle (GGPP) sous forme *trans* est le précurseur immédiat des caroténoïdes. La première étape de cette voie de biosynthèse consiste en la condensation de deux molécules de GGPP pour donner le premier caroténoïde : le 15-*cis*-phytoène qui comporte trois doubles liaisons conjuguées et qui est incolore (Figures 12. et 13.). La phytoène synthétase (PSY) catalyse la réaction de condensation. Cette enzyme, PSY, est similaire à l'enzyme bactérienne (CrtB) et sa séquence comporte également des similarités avec les séquences des prényltransférases (diphosphate de géranyle synthétase, GPS, ou diphosphate de géranylgéranyle synthétase, GGPS). Ensuite, le 15-*cis*-phytoène est transformé en poly-*cis*-lycopène ou polycopène par

**Tableau 3.** Récapitulatif des caractéristiques des gènes et enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez trois espèces: *Citrus sinensis* (ou *C.unshiu*), *Lycopersicon esculentum* et *Arabidopsis thaliana*

Gène	Espèce <sup>a</sup>	Nombre de copies	Acides aminés	Masse moléculaire (kDa)	Cofacteurs	Localisation
<i>Psy</i>	Cs	- <sup>b</sup>	436	49,5	-	enzyme liée à la membrane des plastes
	Le	2	412	46,7	ATP/Mn <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	enzyme liée à la membrane des plastes
	At	1	422	47,5	-	-
<i>Pds</i>	Cs	-	553	61,8	FAD/plastoquinone/PTOX	soluble dans le stroma ou liée à la membrane des plastes
	Le	1	583	64,9	FAD/plastoquinone/PTOX	liée à la membrane des plastes
	At	1	566	63,0	FAD/plastoquinone/PTOX	liée à la membrane des thylakoïdes
<i>Zds</i>	Cs	-	570	63,1	-	-
	Le	1	588	64,7	FAD/plastoquinone/PTOX	-
	At	1	558	61,6	FAD/plastoquinone/PTOX	liée à la membrane des thylakoïdes
<i>Crtiso</i>	Cs	-	-	-	-	-
	Le	1	615	67,5	-	-
	At	-	-	-	-	-
<i>Lcy-b</i>	Cs	-	504	56,5	-	soluble dans le stroma ou liée à la membrane des plastes
	Le	2	500	56,2	-	-
	At	-	501	56,2	-	-
<i>Lcy-e</i>	Cs	-	529	59,0	-	soluble dans le stroma ou liée à la membrane des plastes
	Le	-	526	58,9	-	-
	At	-	524	58,5	-	-
<i>Hy-b</i>	Cs	-	311	34,8	-	présente dans la membrane des plastes
	Le	2	309	34,5	ferrédoxine	-
	At	2	310	34,4	-	-
<i>Zep</i>	Cs	-	664	73,2	-	-
	Le	-	-	-	-	-
	At	1	667	73,8	FAD/oxygène/ferrédoxine	présente dans la membrane des thylakoïdes

<sup>a</sup>Cs, *C. sinensis* ; Le, *Lycopersicon esculentum* ; At, *Arabidopsis thaliana*. <sup>b</sup>non déterminé.

une série de quatre réactions de déshydrogénation ce qui introduit des doubles liaisons supplémentaires. Ces réactions sont catalysées chez les plantes supérieures par la phytoène désaturase (PDS) qui convertit le phytoène en phytofluène puis en  $\zeta$ -carotène et par la  $\zeta$ -carotène désaturase (ZDS) qui transforme le  $\zeta$ -carotène en neurosporène puis en prolycopène (Figures 12. et 13.). Ces réactions de déshydrogénation nécessitent la réduction de la plastoquinone qui sera réoxydée par l'action de la quinone oxygène oxydoréductase (PTOX). Chez les bactéries, une seule enzyme, CRTI, catalyse ces réactions pour former directement le *trans*-lycopène. Dans les tissus non photosynthétiques des plantes supérieures, une caroténoïde isomérase (CRTISO) est nécessaire pour convertir le prolycopène en *trans*-lycopène qui est la forme que nous trouvons généralement lorsque nous analysons les caroténoïdes dans différents tissus. La cyclisation du *trans*-lycopène provoque la division de la voie de biosynthèse en deux branches : l'une conduit au  $\beta$ -carotène et aux  $\beta,\beta$ -xanthophylles tandis que l'autre branche mène à l' $\alpha$ -carotène et aux  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles (Figures 12. et 14.). La lycopène  $\beta$ -cyclase (LCY-b) catalyse la cyclisation du lycopène en deux étapes pour former le  $\beta$ -carotène ( $\beta,\beta$ -carotène). La synthèse de  $\alpha$ -carotène ( $\beta,\epsilon$ -carotène) nécessite l'action de la lycopène  $\epsilon$ -cyclase (LCY-e) puis de la lycopène  $\beta$ -cyclase. Chez la laitue (*Lactuca sativa*) uniquement, une lycopène cyclase (CRTL-E) convertit le lycopène en  $\epsilon,\epsilon$ -carotène. L'introduction de groupements hydroxyles (OH) sur les cycles en position C-3, C-3' conduit à la formation des xanthophylles : la  $\beta$ -cryptoxanthine d'une part et la lutéine d'autre part (Figures 12. et 15.). L'addition du groupement OH sur un cycle beta est catalysée par la  $\beta$ -carotène hydroxylase (HY-b) tandis que cette addition sur un cycle epsilon est catalysée par la  $\epsilon$ -carotène hydroxylase (HY-e). La zéaxanthine formée à partir de la  $\beta$ -cryptoxanthine par l'action de la  $\beta$ -carotène hydroxylase est convertie en violaxanthine par l'action de la zéaxanthine époxydase (ZEP) en deux étapes (Figures 12. et 15.). Dans les feuilles, en cas d'éclairement excessif, la zéaxanthine est régénérée à partir de la violaxanthine grâce à deux réactions catalysées par la violaxanthine dé-époxydase (VDE) (Demmig-adams *et al.*, 1996). Ce cycle zéaxanthine-violaxanthine est appelé cycle des xanthophylles. La dernière étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes consiste en la transformation de la violaxanthine en néoxanthine, réaction catalysée par la néoxanthine synthétase (NSY). Nous devons également noter que la violaxanthine et la néoxanthine servent de précurseurs pour la synthèse de l'acide abscissique (ABA) (Figures 12. et 16.). Par ailleurs, chez le poivron (*Capsicum annuum*), la capsanthine-capsorubine synthétase (CCS) transforme l'anthéaxanthine et la violaxanthine en respectivement la capsanthine et la capsorubine. Ces deux composés sont responsables de la couleur rouge-orangée spécifique du poivron. Les gènes et enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes sont détaillés dans le tableau 3.



Les enzymes sont: 1. **PDS**, phytoène désaturase; 2. **ZDS**, ζ-carotène désaturase; 3. **CRTISO**, caroténoïde isomérase.

**Figure 13.** Les étapes de déshydrogénation du phytoène et synthèse du *trans*-lycopène.

## I.2.3.2.1. Gène codant pour la phytoène synthétase (PSY)

Le gène codant pour la phytoène synthétase a été isolé et séquencé chez plusieurs espèces dont *Arabidopsis thaliana*, la tomate (*lycopersicon esculentum*), le maïs (*Zea mays*), la carotte (*Daucus corota*), le poivron (*Capsicum annuum*), le riz (*Oryza sativa*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) et les agrumes (*Citrus*) (BARTLEY et SCOLNIK, 1993 ; FRASER *et al.*, 1994 ; IKOMA *et al.*, 2001 ; BUSCH *et al.*, 2002 ; LANGE et GHASSEMIAN, 2003 ; GALLAGHER *et al.*, 2004 ; INOUE *et al.*, 2006). Chez les agrumes, les séquences codantes complètes sont disponibles dans les bases de données [GenBank numéro d'accèsion : AB037975, AF220218 (*C. unshiu*), DQ235260 (*C. sinensis*), AF152892 (*C. paradisi*)]. Deux gènes codant pour la phytoène synthétase ont été isolés chez la tomate (BARTLEY et SCOLNIK, 1993), le tabac (BUSCH *et al.*, 2002), le maïs et le riz (GALLAGHER *et al.*, 2004). En revanche, ce gène est présent en seule copie chez *Arabidopsis thaliana* et chez le poivron (ROMER *et al.*, 1993). Chez la tomate, *Psy-1* code pour une enzyme spécifique des chromoplastes des fruits tandis que *Psy-2* code pour une protéine spécifique des tissus photosynthétiques. Chez la tomate et l'orange, la phytoène synthétase est localisée dans les plastides et est associée à la membrane (INOUE *et al.*, 2006). Certains travaux sur la tomate ont montré que PSY était associée à certaines enzymes de la synthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP) dans un complexe protéique de taille supérieure à 200 kDa (HIRSCHBERG, 2001). La phytoène synthétase isolée et purifiée chez la tomate est active en présence d'ATP et d'ions divalents comme  $Mn^{2+}$  (FRASER ET BRAMLEY, 2004).

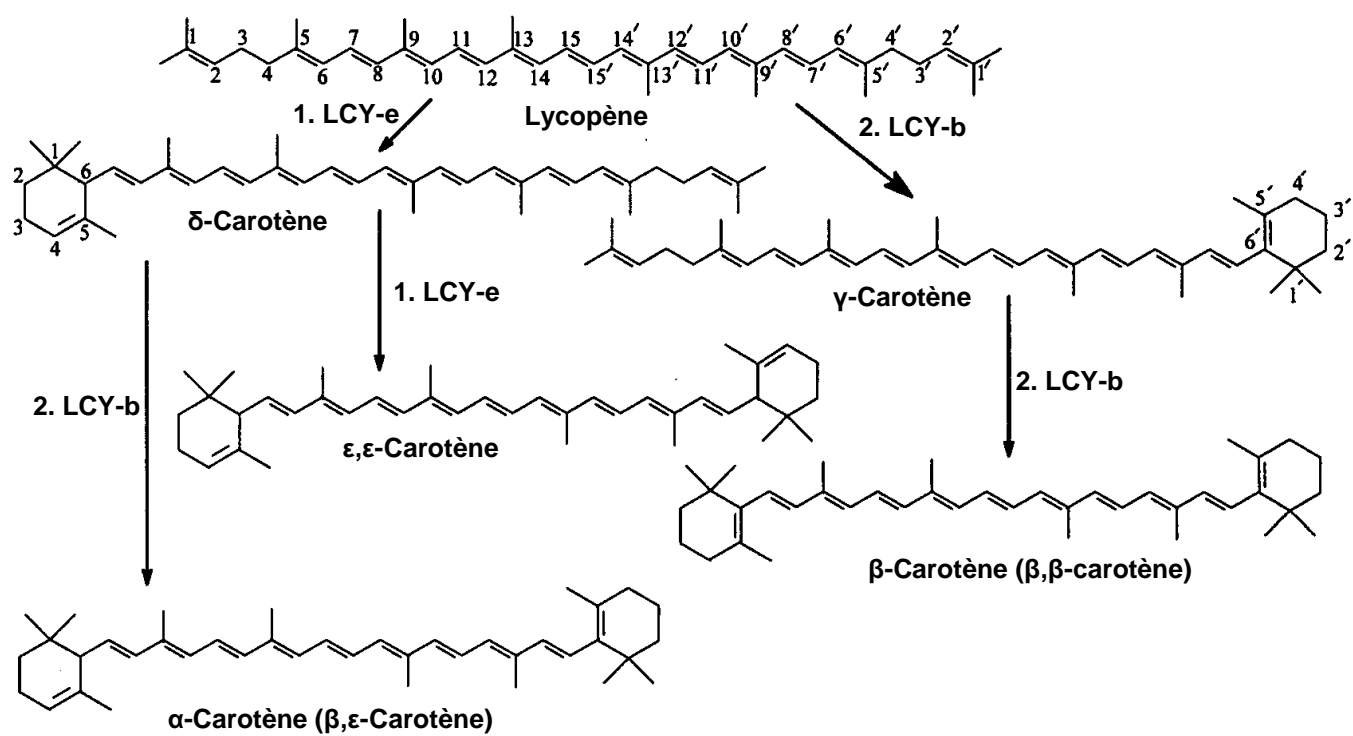
## I.2.3.2.2. Gènes codant pour la phytoène désaturase (PDS) et la ζ-carotène désaturase (ZDS)

Le gène codant pour la phytoène désaturase a été cloné et séquencé chez différentes espèces dont *Arabidopsis thaliana*, la tomate (*lycopersicon esculentum*), le maïs (*Zea mays*), le poivron (*Capsicum annuum*), le riz (*Oryza sativa*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) et les agrumes (*Citrus*). De même le gène codant pour la ζ-carotène désaturase a été séquencé chez *Arabidopsis thaliana*, la tomate (*lycopersicon esculentum*), le maïs (*Zea mays*) et le poivron (*Capsicum annuum*) (FRASER *et al.*, 1994 ; KITA *et al.* 2001 ; BUSCH *et al.*, 2002 ; MATTHEWS *et al.*, 2003 ; INOUE *et al.*, 2006). Les ADNc complets séquencés sur agrumes sont disponibles dans les bases de données [GenBank numéro d'accèsion : AB046992 (*C. unshiu*), AF364515 (*C. paradisi*), AJ319761, DQ235261 (*C. sinensis*) pour *Pds* et AB072343, DQ309869 (*C. unshiu*), AF372617 (*C. paradisi*), AJ319762 (*C. sinensis*) pour *Zds*]. Chez *Arabidopsis thaliana*, le maïs et le riz, les gènes codant pour ces deux enzymes sont présents

en une seule copie (MATTHEWS *et al.*, 2003). Les séquences de la phytoène désaturase et de  $\zeta$ -carotène désaturase comportent des sites de liaison aux FAD. La comparaison des séquences des gènes *Pds* et *Zds* montre que ces séquences sont similaires à 33-35%. Ces deux enzymes situées dans les plastes catalysent des réactions de déshydrogénation qui permettent d'ajouter des doubles liaisons et qui convertissent le 15-*cis*-lycopène (incolore, 3 doubles liaisons conjuguées) en *cis*-lycopène ou pro-lycopène (rouge, 11 doubles liaisons conjuguées) (Figure 13.). Les déshydrogénations se font en présence de plastoquinone qui est réduite et nécessitent un accepteur final d'électrons pour régénérer la plastoquinone (PTOX). Le mutant de la tomate appelé *Ghost* qui a un gène *Ptox* non fonctionnel accumule du phytoène (FRASER et BRAMLEY, 2004).

#### I.2.3.2.3 Gène codant pour la caroténoïde isomérase (CRTISO)

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, les plantes supérieures produisent du 15-*cis*-lycopène puis du *trans*-lycopène qui subira ensuite des réactions de cyclisations. Ainsi, une caroténoïde isomérase intervient *in vivo* au cours des réactions de déshydrogénation pour former le *trans*-lycopène (Figures 12. et 13.). En 2002, ISAACSON *et al.* ont isolé et séquencé le gène codant pour la caroténoïde isomérase (CRTISO) à partir de l'analyse d'un mutant de tomate orange appelé « Tangerine » et accumulant du prolycopène (7Z, 9Z, 7'Z, 9'Z-tétra-*cis*-lycopène) à la place du *trans*-lycopène. Le gène responsable de ce phénotype orange code pour une enzyme catalysant des réactions d'oxydoréduction de structure similaire à la phytoène désaturase d'origine bactérienne (CRTI). L'expression de *Crtiso* dans *Escherichia coli* produisant du *cis*-phytoène a confirmé l'activité de *cis* / *trans* isomérisation des carotènes et en particulier du prolycopène. Des analyses utilisant la méthode du *Southern-blot* ont montré que le gène codant pour la CRTISO est présent en une seule copie chez la tomate. Un gène orthologue codant pour CRTISO a également été isolé chez *Arabidopsis thaliana*. En 2004, KATO *et al.* ont isolé et séquencé partiellement le gène codant pour CRTISO chez la mandarine Satsuma (*C. unshiu*) (numéro d'accension GenBank : AB114651) afin d'étudier l'expression de ce gène au cours de la maturation des fruits d'agrumes. D'après ISAACSON *et al.* (2002), le gène *Crtiso* code pour une enzyme de masse 67,5 kDa et les séquences d'acides aminés du type sauvage et du type muté sont identiques. En revanche le mutant « Tangerine » présente dans la séquence d'ADN une délétion de 348 pb dans la région du promoteur ce qui inhibe l'expression du gène et entraîne l'accumulation du prolycopène. CRTISO serait active en même tant que ZDS dans les tissus non photosynthétiques ou en absence de lumière. Dans les tissus photosynthétiques, la lumière peut remplacer CRTISO pour l'isomérisation des carotènes. Enfin, l'accumulation de



Les enzymes sont: 1. **LCY-e**, lycopène  $\epsilon$ -cyclase; 2. **LCY-b**, lycopène  $\beta$ -cyclase.

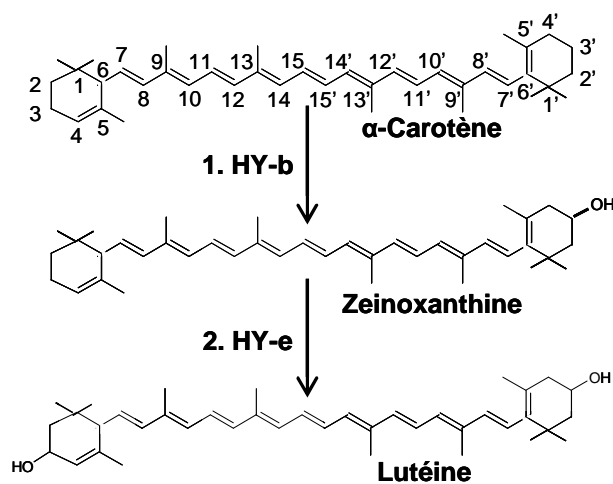
**Figure 14.** Les étapes de cyclisation du lycopène.



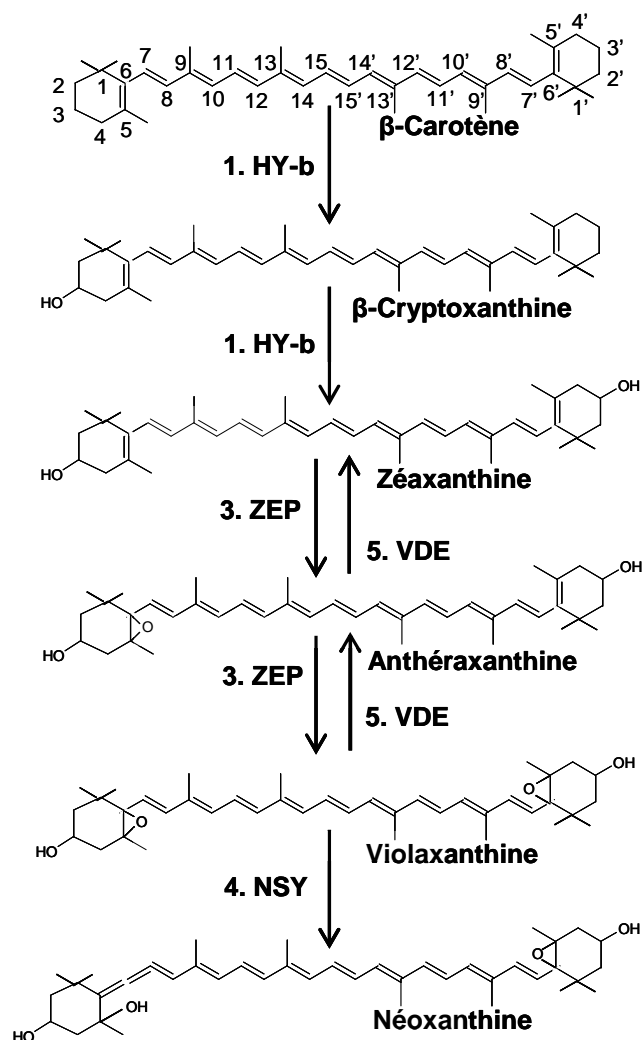
prolycopène et les faibles teneurs en  $\beta$ -carotène chez le type mutant suggèrent que la configuration *trans* est nécessaire pour la cyclisation du lycopène (ISAACSON *et al.*, 2002).

#### I.2.3.2.4. Gènes codant pour la lycopène $\beta$ -cyclase (LCY-b) et la lycopène $\epsilon$ -cyclase (LCY-e)

Le *trans*-lycopène sert de précurseur aux cyclases. Deux types de cycles peuvent être formés à l'extrémité des molécules en fonction de l'enzyme catalysant la réaction au niveau de la double liaison C-1, 2 : un cycle beta (insaturation en position C-5, 6 ou C-5', 6' dans le cycle, réaction catalysée par la lycopène  $\beta$ -cyclase) et un cycle epsilon (insaturation en position C-4, 5 ou C-4', 5' dans le cycle, réaction catalysée par la lycopène  $\epsilon$ -cyclase). La lycopène  $\beta$ -cyclase peut introduire deux cycles beta pour former le  $\beta$ -carotène via le  $\delta$ -carotène tandis que la lycopène  $\epsilon$ -cyclase ne peut former qu'un cycle epsilon à une extrémité et l'intervention des deux enzymes est nécessaire pour la formation de l' $\alpha$ -carotène (PECKER *et al.*, 1996)(Figure 14.). Le gène codant pour la lycopène  $\beta$ -cyclase a été isolé chez *Arabidopsis thaliana* (CUNNINGHAM *et al.*, 1996), *Narcissus* (numéro d'accension X98796), le tabac (*Nicotiana tabacum*) (numéro d'accension F13561), le poivron (*Capsicum Annuum*) (HUGUENEY *et al.*, 1995) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (RONEN *et al.*, 2000). Les ADNc complets ont été séquencés chez les agrumes et les séquences sont disponibles dans les bases de données [numéro d'accension GenBank : AY166796 (*C. unshiu*), AY644699, AY094582, AY679167, AY679168, AF240787 DQ235259 (*C. sinensis*), AF152246, (*C. paradisi*), AF217103 (*C. maxima*)]. Chez la tomate, deux gènes codant pour la lycopène  $\beta$ -cyclase ont été identifiés : l'un des gènes est exprimé dans les chromoplastes des fruits (gène *Cyc-b*) tandis que l'autre gène est spécifique des chloroplastes des tissus chlorophylliens (RONEN *et al.*, 2000). Le gène codant pour la lycopène  $\epsilon$ -cyclase a également été isolé chez les agrumes [numéro d'accension GenBank : DQ228870 (*C. unshiu*), AY533827 (*C. sinensis*), AF486650 (*C. paradisi*), AY994158 (*C. maxima*)], chez *Arabidopsis thaliana* (CUNNINGHAM et GANTT, 2001) et chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (RONEN *et al.*, 1999). Les deux enzymes (LCY-b et LCY-e) ont des séquences d'acides aminés présentant 30% de portions identiques et possèdent des sites de liaison aux FAD / NADP. Les enzymes LCY-b et CYC-b de la tomate présentent 53% de similarités. De plus, CYC-b de la tomate est plus proche de la capsanthine / capsorubine synthétase (CCS) du poivron (86,1% de portions identiques). Les gènes *Cyc-b* et *Ccs* proviendraient d'un même gène à la suite d'un phénomène de duplication (HIRSCHBERG, 2001). Enfin, d'après les travaux d'INOUE *et al.* (2006), les deux lycopène cyclases (LCY-b et LCY-e) sont adressées à la fois dans le stroma et dans la membrane des plastides ; avec LCY-e qui est davantage liée à



Les enzymes sont: 1. **HY-b**, β-carotène hydroxylase; 2. **HY-e**, ε-carotène hydroxylase; 3. **ZEP**, zéaxanthine époxydase; 4. **NSY**, néoxanthine synthétase; 5. **VDE**, violaxanthine de-époxydase.



**Figure 15.** Les étapes de la synthèse des xanthophylles.

la membrane que LCY-b ce qui pourrait expliquer le fait que LCY-e ne puisse agir qu'avec une extrémité du *trans*-lycopène.

#### I.2.3.2.5 Gènes codant pour la $\beta$ -carotène hydroxylase (HY-b) et la $\epsilon$ -carotène hydroxylase (HY-e)

L'hydroxylation des caroténoïdes cycliques en position C-3 et C-3' est catalysée par deux types d'enzymes : la  $\beta$ -carotène hydroxylase qui introduit des groupement hydroxyles sur des cycles beta et la  $\epsilon$ -carotène hydroxylase qui catalyse la même réaction sur les cycles epsilon (Figure 15.). Le gène codant pour la  $\beta$ -carotène hydroxylase a été isolé et séquencé chez *Arabidopsis thaliana* (LANGE et GHASSEMIAN, 2003), la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (HIRSCHBERG, 2001), le poivron (*Capsicum annuum*) (BOUVIER *et al.*, 1998b) et les agrumes (*Citrus*) (KIM *et al.*, 2001). Les ADNc complets séquencés sur agrumes sont disponibles dans les bases de données [numéro d'accension GenBank : AF315289, AF296158, DQ228870, (*C. unshiu*), AM408542 (*C. kinokuni*), DQ002893, (*C. maxima*)]. Deux gènes codant pour la  $\beta$ -carotène hydroxylase ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* et la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (HIRSCHBERG, 2001 ; LANGE et GHASSEMIAN, 2003). Chez la tomate une  $\beta$ -carotène hydroxylase est spécifique des chromoplastes des fleurs tandis que la deuxième HY-b est présente dans les chloroplastes des tissus verts. Les  $\beta$ -carotène hydroxylases agissent en présence de ferrédoxine, transporteur d'électron, et de fer. Les séquences d'acides aminés présentent des domaines particuliers qui sont responsables de l'adressage in vivo de ces enzymes dans la membrane des plastes (FRASER et BRAMLEY, 2004 ; INOUE *et al.*, 2006). Enfin, à notre connaissance, le gène codant pour la  $\epsilon$ -carotène hydroxylase n'a pas encore été isolé chez les plantes supérieures.

#### I.2.3.2.6. Gène codant pour la zéaxanthine époxydase (ZEP)

La zéaxanthine époxydase catalyse la formation d'un époxyde au niveau de l'insaturation du cycle beta de la zéaxanthine pour donner la violaxanthine (Figure 15.). Cette réaction d'oxydoréduction nécessite la présence de ferrédoxine à l'état réduit. Dans les feuilles (tissus chlorophylliens), cette réaction est réversible et la violaxanthine déépoxydase (VDE) convertit la violaxanthine en zéaxanthine. La violaxanthine déépoxydase est activée à faible pH lorsque la plante est soumise à un excès de lumière (HIRSCHBERG, 2001). Le gène codant pour la zéaxanthine époxydase a été isolé chez *Arabidopsis thaliana* (LANGE et GHASSEMIAN, 2003), l'abricot (*Prunus armeniaca*) (numéro d'accension AF159948), la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (numéro d'accension Z83835), le tabac (*Nicotiana tabacum*)

(MARIN *et al.*, 1996) le poivron (*Capsicum Annuum*) (BOUVIER *et al.*, 1996) et les agrumes (*Citrus*). L'ADNc complet est disponible chez les agrumes (GenBank numéro d'accès : AB075547, *C. unshiu*). Le gène codant pour ZEP est présent en une seule copie dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (LANGE et GHASSEMIAN, 2003). L'étude des séquences d'acides aminés de ZEP et VDE indique que ces enzymes appartiennent à la classe des protéines appelées lipocalines (FRASER et BRAMLEY, 2004).

#### I.2.3.2.7. Gène codant pour la néoxanthine synthétase (NSY)

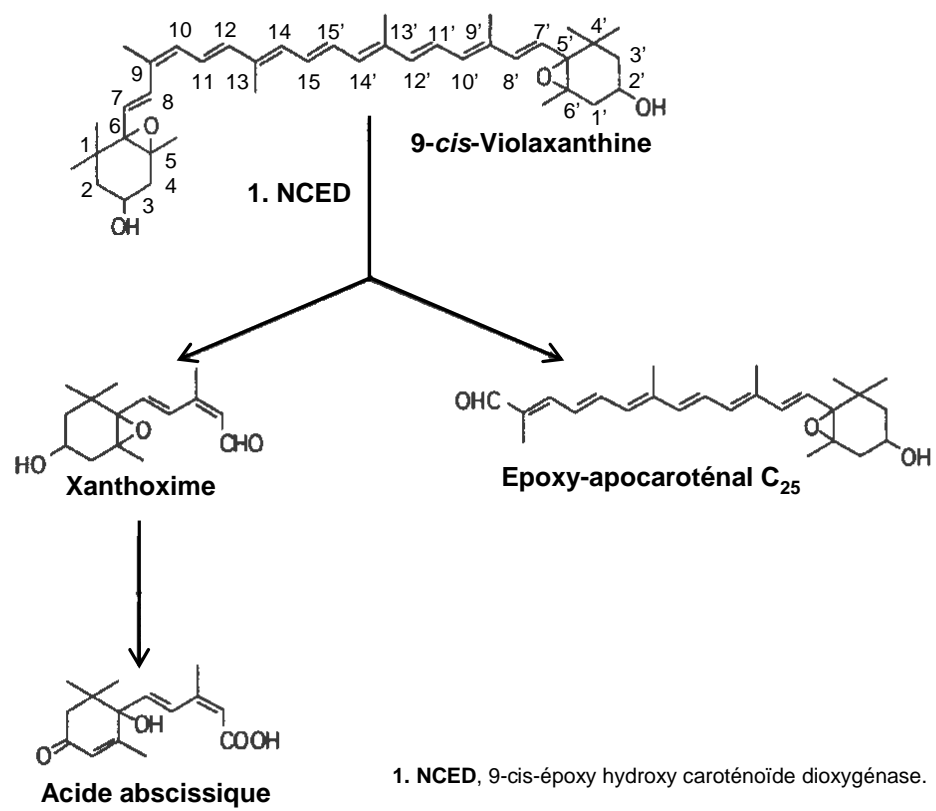
La néoxanthine synthétase est responsable de la formation de la néoxanthine à partir de la violaxanthine par un réarrangement du groupe époxyde (Figure 15.). La néoxanthine synthétase a été isolée chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (AL BABILI *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* et la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (BOUVIER *et al.*, 2000). La séquence de la néoxanthine synthétase isolée à partir de la tomate présente 99% de portions identiques à celles de la CYC-b. A notre connaissance, la néoxanthine synthétase n'a pas été isolée chez les agrumes et la néoxanthine n'a pas été identifiée dans les jus d'agrumes.

### **I.2.3.3. Catabolisme des caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont dégradés par deux types de réaction : les réactions catalysées par des enzymes (NCED, CCD) et les réactions non enzymatiques (lumière, oxydation). Les teneurs en caroténoïdes déterminées à un temps donné correspondent au bilan entre la synthèse et le catabolisme. Synthèse et dégradation sont contrôlés pour maintenir certaines teneurs en caroténoïdes dans les tissus des plantes. La connaissance des réactions de dégradation des caroténoïdes est nécessaire pour l'étude des mécanismes de régulation des compositions en caroténoïdes des fruits d'agrumes. Les caroténoïdes sont métabolisés en apocaroténoïdes qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et l'adaptation des plantes à leur environnement. Les produits de dégradation sont des phytohormones, des composés de défense de la plante et des composés aromatiques. Ces produits sont détaillés ci-dessous.

#### I.2.3.3.1. Réactions enzymatiques

La 9-*cis* époxy hydroxy caroténoïde dioxigénase (NCED) catalyse la réaction de clivage des caroténoïdes en position C-11,12. Le gène codant pour cette enzyme a été isolé et séquencé chez plusieurs plantes dont le maïs (*Zea mays*, SCHWARTZ *et al.*, 1997), la tomate



**Figure 16.** Utilisation de la violaxanthine pour la synthèse de l'acide abscissique.

(*Lycopersicon esculentum*, BURBIDGE *et al.*, 1999), *Arabidopsis thaliana* (IUCHI *et al.*, 2001 ; TAN *et al.*, 2003) et les agrumes (*Citrus*, KATO *et al.*, 2006 ; RODRIGO *et al.*, 2006). Neuf gènes codant pour NCED ont été isolés chez *Arabidopsis* (TAN *et al.*, 2003). Chez les agrumes KATO *et al.* (2006) et RODRIGO *et al.* (2006) ont isolé deux séquences codant pour NCED. Les analyses *in vitro* ont montré que NCED utilise la 9-*cis*-violaxanthine, la 9-*cis*-néoxanthine ou la 9-*cis*-zéaxanthine comme substrat pour former un époxy-apocaroténal en C<sub>25</sub> puis la xanthoxine en C<sub>15</sub>, précurseur de l'acide abscissique (voir Figure 16.). L'enzyme reconnaît les groupes 3-hydroxyles et 5,6-époxyde ; la double liaison *cis* en position 9 semble nécessaire (SANDMANN *et al.*, 2006). L'acide abscissique est important pour le développement des graines et l'adaptation des végétaux aux conditions environnementales (LEUNG et GIRAUDAT, 1998). D'après KATO *et al.* (2006), CitNCED2 et CitNCED3 catalysent le clivage de la 9-*cis*-violaxanthin en position C-11,12 pour former la xanthoxine. Chez la mandarine (*C. unshiu*) et le citron (*C. limon*) l'augmentation de l'expression du gène *CitNced2* dans le flavédo et dans les sacs à jus des fruits s'accompagne de l'accumulation de l'acide abscissique tandis que dans les sacs à jus de l'orange (*C. sinensis*), il n'y a pas d'augmentation de l'expression du gène *CitNced2* et des teneurs en acide abscissique. D'après RODRIGO *et al.* (2006) *CsNced1* est exprimé dans les feuilles et dans les fruits et *CsNced2* est plus spécifique des chromoplastes. De plus la 9-*cis*-violaxanthine semble être le substrat des caroténoïdes dioxygénases dans le flavédo des fruits tandis que dans les feuilles, la 9'-*cis*-néoxanthine est le substrat utilisé pour former l'acide abscissique.

Les caroténoïdes dioxygénases (CCD) catalysent le clivage de nombreux caroténoïdes en position C-9,10 (C-9',10') pour former un dialdéhyde en C<sub>14</sub> et deux produits en C<sub>13</sub> (SCHWARTZ *et al.*, 2001). Les produits formés dépendent du substrat. Ainsi, la coupure du β-carotène catalysée par CCD1 conduit à la formation de l'apocaroténoïde volatil, β-ionone, arôme important chez les fleurs et les fruits (SCHWARTZ *et al.*, 2001). Ce gène a été séquencé chez *Arabidopsis thaliana* (SCHWARTZ *et al.*, 2001), la tomate (*Lycopersicon esculentum*, SIMKIN *et al.*, 2004) et *Crocus sativus* (BOUVIER *et al.*, 2003a). Chez *Crocus sativus*, un gène similaire (*Zcd*) codant pour une CCD catalysant le clivage en position C-7,8 (C-7'-8') a été isolé (BOUVIER *et al.*, 2003a). La zéaxanthine dioxygénase (ZCD) utilise la zéaxanthine comme substrat pour former un précurseur de la crocétine. Chez *Crocus sativus*, ZCD est localisée dans les plastes et le gène codant pour cette enzyme est uniquement exprimé dans les tissus du style tandis que CCD se trouve dans le cytoplasme et le gène correspondant est exprimé dans les fleurs et les feuilles. De plus, toujours chez cette espèce, CCD catalyse les réactions conduisant à la synthèse de l'arôme de safran (BOUVIER *et al.*, 2003a). Les travaux sur la tomate ont permis d'isoler deux gènes codant pour une caroténoïde

dioxygénase (CCD) dont l'un est fortement exprimé dans les fruits au cours de la maturation (SIMKIN *et al.*, 2004). Récemment, le gène codant pour une lycopène dioxygénase (LCD), clivant le lycopène en position C-5,6 (C-5',6'), a été isolé chez *Bixia orellana*. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de la bixine (BOUVIER *et al.*, 2003b). L'enzyme CitCCD1, isolée chez les agrumes, peut utiliser la  $\beta$ -cryptoxanthine, la zéaxanthine, la *trans* ou *cis*-violaxanthine comme substrat (KATO *et al.*, 2006). L'expression du gène codant pour CitCCD1 augmente dans le flavédo et les sacs à jus de la mandarine (*C. ushiu*), de l'orange (*C. sinensis*) et du citron (*C. limon*) au cours de la maturation des fruits.

#### I.2.3.3.2. Autres dégradations

La principale dégradation a lieu dans les feuilles par un phénomène de photooxydation. Le  $\beta$ -carotène présent au niveau des photosystèmes est transformé en  $\beta$ -carotène-5,6-époxyde. La quantité de caroténoïdes dégradés dans les feuilles du poivron soumises à une forte lumière est estimée à 1 mg par jour. Ces pertes sont supérieures aux quantités synthétisées ce qui entraîne une diminution des caroténoïdes sous ces conditions (SIMKIN *et al.*, 2003a). D'autres produits d'oxydation peuvent être formés. Des analyses *in vitro* ont montré que l'oxydation du  $\beta$ -carotène par l'action de l'oxygène singulet conduit principalement à la formation du  $\beta$ -carotène-5,6-époxyde et du  $\beta$ -carotène-5,8-endopéroxyde (YAMAUCHI *et al.*, 1998). Les autres produits d'oxydation sont des composés à 4 ou 6 atomes d'oxygènes. Des oxydations plus poussées entraînent la coupure de la structure à 40 atomes de carbone pour donner des produits difficiles à analyser. D'autres analyses *in vitro* ont montré que le  $\beta$ -carotène pouvait être oxydé en apo-carotenals ( $\beta$ -apo-14'-caroténal et  $\beta$ -apo-13-caroténone) (HENRY *et al.*, 2000). Les mécanismes d'oxydation *in vivo* sont encore mal compris.

#### **I.2.4. Mécanismes de régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans les fruits et en particuliers dans les sacs à jus des fruits d'agrumes**

La phase de maturation des fruits, caractérisée par des transformations conférant aux fruits leur qualité organoleptique (couleur, texture, saveur, arômes), correspond à un programme de développement hautement régulé. Les modifications de l'expression génique jouent un rôle majeur dans les variations métaboliques. Les fruits climactériques, pour lesquels la maturation s'accompagne d'une augmentation brusque de la respiration sont distingués des fruits non-climactériques. Dans le cas des fruits climactériques, l'éthylène joue un rôle crucial dans le processus de maturation. Nous rappelons que la tomate (*Lycopersicon esculentum*), qui sert de modèle d'étude pour le développement et la maturation des fruits, est

un fruit climactérique tandis que les agrumes font partie des fruits non-climactériques. Les nombreux mutants de tomate affectés dans la pigmentation ont facilité l'identification des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes et la compréhension des mécanismes complexes qui régulent leur accumulation. Ainsi, nous détaillerons ci-dessous quels sont les facteurs influençant la biosynthèse des caroténoïdes et qui conduisent à l'accumulation de ces pigments dans les fruits de la tomate (*Lycopersicon esculentum*), de l'abricot (*Prunus armeniaca*) fruit climactérique, du poivron fruit non-climactérique (*Capsicum annuum*), et surtout dans les sacs à jus des agrumes (*Citrus*).

La composition en caroténoïdes des fruits mûrs est le résultat d'un équilibre entre la synthèse d'une part et la dégradation ou l'utilisation des caroténoïdes d'autre part. Comme nous l'avons déjà mentionné, les fruits d'agrumes présentent dans la peau et dans les sacs à jus des compositions en caroténoïdes qualitativement et quantitativement différentes. De plus, au cours du développement du fruit, la coloration de la peau résulte de deux phénomènes. Cette coloration est due d'une part à la dégradation des chlorophylles et d'autre part à l'accumulation des caroténoïdes. Nous rappelons aussi que la biosynthèse des chlorophylles utilise le diphosphate de géranylgéranyle comme précurseur (Figure 9.). A l'inverse, dans les premiers stades de développement, les sacs à jus des fruits d'agrumes présentent peu de chlorophylles et peu de caroténoïdes. La coloration des sacs à jus est liée à l'augmentation de la synthèse des caroténoïdes et à l'accumulation de ces derniers. D'après ALOS *et al.* (2006) et KATO *et al.* (2006), les mécanismes de régulation intervenant dans la peau et dans les sacs à jus des fruits d'agrumes semblent différents. Ainsi, nous préciserons pour les agrumes si les analyses concernent la peau ou les sacs à jus des fruits et nous détaillerons davantage ce dernier cas de figure.

#### **I.2.4.1.....Rôle de l'expression des gènes, régulation au niveau transcriptionnel**

##### **I.2.4.1.1. Expression des gènes de biosynthèse et relation avec les compositions en caroténoïdes des fruits et en particuliers des fruits d'agrumes**

De nombreux auteurs ont étudié l'accumulation des caroténoïdes dans les chromoplastes des fruits (RÖMER *et al.*, 1993 ; IKOMA *et al.*, 2001 ; KIM *et al.*, 2001 ; KITA *et al.*, 2001 ; BRAMLEY, 2002 ; KATO *et al.*, 2004 ; RODRIGO *et al.*, 2004 ; MARTY *et al.*, 2005). Au cours du développement du fruit, les chloroplastes se transforment en chromoplastes et les caroténoïdes sont synthétisés *de novo*. La coordination de l'expression des gènes de biosynthèse semble un facteur important dans l'accumulation des caroténoïdes. La



biosynthèse des caroténoïdes au cours de la maturation des fruits de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) a été très étudiée et cette espèce constitue un modèle pour la compréhension des mécanismes de régulation de la biosynthèse des caroténoïdes dans les chromoplastes des fruits (PECKER *et al.*, 1992 ; GIULIANO *et al.*, 1993 ; FRASER *et al.*, 1994 ; CORONA *et al.*, 1996 ; PECKER *et al.*, 1996 ; RONEN *et al.*, 1999 ; BRAMLEY, 2002 ; FRASER *et al.*, 2002). Au cours de la maturation des fruits de la tomate, les teneurs en caroténoïdes augmentent 10 à 14 fois. Ceci est principalement dû à l'accumulation d'un caroténoïde : le lycopène (FRASER *et al.*, 1994 ; BRAMLEY, 2002). Au début de la coloration des fruits, les quantités de transcrits des gènes *Psy* et *Pds* augmentent fortement tandis que les transcrits des gènes *Lcy-b* et *Lcy-e* diminuent. L'accumulation du lycopène semble être le résultat de l'augmentation de la synthèse des carotènes acycliques et du blocage de la formation des xanthophylles. De plus des études sur l'activité de ces enzymes, après extraction des enzymes et marquage radioactif des substrats, montrent que l'activité des enzymes augmente parallèlement à l'élévation du niveau d'expression des gènes codant pour ces enzymes. Ces analyses montrent également que l'étape catalysée par la phytoène synthétase constitue une étape clé pour la synthèse des caroténoïdes dans les fruits de la tomate (FRASER *et al.*, 2002). De même, chez le poivron, l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes augmentent au cours de la maturation des fruits et la régulation au niveau de la transcription des gènes semble être un facteur important de l'accumulation des caroténoïdes dans les chromoplastes (RÖMER *et al.*, 1993). Le stress oxydant observé lors de la différenciation des chloroplastes en chromoplastes au cours de la maturation du poivron semble jouer un rôle sur la synthèse des caroténoïdes en modifiant le niveau d'expression des gènes de biosynthèse (BOUVIER *et al.*, 1998c). Les fruits de l'abricot GOLDRICH (*Prunus armeniaca*) sont oranges et accumulent principalement le phytoène, le phytofluène et le  $\beta$ -carotène tandis que les fruits de l'abricot Monique sont blancs et produisent principalement du phytoène et du phytofluène incolores (MARTY *et al.*, 2005). Cependant l'expression des gènes *Psy-1*, *Pds* et *Zds* est toujours plus élevée dans les fruits du cultivar Monique que dans les fruits du cultivar Goldrich (MARTY *et al.*, 2005). Chez les agrumes, d'après RODRIGO *et al.* (2004), la peau des fruits de l'orange Navelate (*C. sinensis*) accumule principalement la 9-*cis*-violaxanthine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, la zéaxanthine et le phytoène. Parallèlement à la détermination des caroténoïdes au cours de la maturation des fruits, RODRIGO *et al.* (2004) ont étudié l'expression des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Ptox*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* par analyses *Northern-Blot*. Au cours de la maturation, l'expression du gène *Pds* est corrélée avec les teneurs en caroténoïdes. L'augmentation des concentrations en caroténoïdes est liée à la surexpression des gènes *Psy* et *Zds*. De plus, le passage de la synthèse des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles à la synthèse des  $\beta,\beta$ -xanthophylles est liée à la diminution des transcrits du gène *Lcy-e* et à l'augmentation

des transcrits du gène *Hy-b*. L'accumulation des caroténoïdes dans les sacs à jus des fruits d'agrumes est différente au cours de la maturation. L'orange Valencia (*C. sinensis*) présente peu de caroténoïdes et peu de chlorophylles dans les sacs à jus dans les premiers stades de développement des fruits et il n'y a pas de transition synthèse des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles / synthèse des  $\beta,\beta$ -xanthophylles au moment de la coloration des fruits (KATO et al., 2004). D'après KATO *et al.* (2004), la mandarine Satsuma (*C. unshiu*) accumule principalement la  $\beta$ -cryptoxanthine dans les sacs à jus, l'orange Valencia (*C. sinensis*) accumule majoritairement les isomères *trans* et *cis* de la violaxanthine tandis que le citron de Lisbonne (*C. limon*) présente très peu de caroténoïdes. Au cours du développement des fruits, le niveau d'expression des gènes *CitPsy*, *CitPds*, *CitZds*, *CitLcy-b*, *CitHy-b* et *CitZep* augmente dans les sacs à jus de la mandarine et de l'orange ce qui semble être responsable de l'accumulation des  $\beta,\beta$ -xanthophylles. Le niveau d'expression des gènes conduisant aux  $\beta,\beta$ -xanthophylles est plus faible dans les sacs à jus du citron comparé au niveau d'expression déterminé dans les fruits de la mandarine. Cependant les différences entre l'orange et le citron ne paraissent pas liées à l'expression de ces gènes (KATO *et al.*, 2004). Ainsi, seuls KATO *et al.* (2004) ont étudié l'accumulation des caroténoïdes dans trois espèces différentes d'agrumes et ont ainsi apporté des informations sur les facteurs contrôlant les différentes accumulations au niveau interspécifiques. Cependant une étude comportant un plus grand nombre d'espèces d'agrumes et plusieurs variétés par espèce est nécessaire pour la compréhension des différentes accumulations des caroténoïdes chez les différentes espèces et variétés. Nous manquons également d'informations sur les étapes clés dans la biosynthèse des caroténoïdes dans les sacs à jus des fruits d'agrumes. De plus, d'après KIM *et al.* (2001), la biosynthèse de la  $\beta$ -cryptoxanthine augmente dans les sacs à jus de trois variétés de mandarines au cours du développement des fruits. Cependant l'expression du gène *Hy-b*, codant pour la  $\beta$ -carotène hydroxylase responsable de la formation de la  $\beta$ -cryptoxanthine n'est pas corrélée à la synthèse de ce composé au cours de la maturation. L'abondance des transcrits du gène *Hy-b* relevée dans les fruits des différentes variétés ne coïncide pas avec les différentes teneurs en  $\beta$ -cryptoxanthine (KIM *et al.*, 2001). Ceci met en évidence que la régulation au niveau transcriptionnel n'est pas le seul facteur de régulation chez les *Citrus*. D'autres mécanismes influencent aussi le contrôle de l'accumulation des caroténoïdes et les différences inter et intraspécifiques.

#### I.2.4.1.2. Expression des gènes responsables de la formation des précurseurs ou des gènes intervenant dans le catabolisme et relations avec les compositions en caroténoïdes

Comme nous l'avons déjà mentionné, le diphosphate de géranylgeranyle (GGPP), précurseur immédiat des caroténoïdes, est principalement issu de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP). De plus, ce composé en C<sub>20</sub> est aussi utilisé pour la synthèse gibbérellines, phylloquinones, tocophérols et chlorophylles (Figure 9.). Les quantités de diphosphate de géranylgeranyle disponibles pour la synthèse des caroténoïdes jouent un rôle dans l'accumulation de ces derniers. D'après les études de BOTELLA-PAVIA *et al.* (2004) sur les fruits de la tomate, l'étape catalysée par la DXS est une étape limitante pour la synthèse des caroténoïdes. En effet, l'expression du gène *Dxs* varie au cours du développement du fruit et est corrélée à la synthèse des caroténoïdes (LOIS *et al.*, 2000). L'obtention de plantes génétiquement modifiées (notamment chez la tomate) a permis de mieux comprendre quelles sont les étapes importantes dans la biosynthèse et quels sont les liens avec les autres voies impliquées dans la synthèse des précurseurs ou le catabolisme des caroténoïdes (HIRSCHBERG, 2001 ; BRAMLEY, 2002 ; BOTELLA-PAVIA ET RODRIGUEZ-CONCEPTION, 2006 ; SANDMANN *et al.*, 2006). La surexpression du gène *Psy-1* chez la tomate par l'expression d'un gène *Psy-1* additionnel, spécifique des chromoplastes, introduit dans les plants de tomates a entraîné l'accumulation des caroténoïdes dans les tissus verts et les jeunes fruits des plants transformés (FRAY *et al.*, 1995). Cependant, les fruits mûrs présentent des teneurs en lycopène plus faibles que les fruits des plants non transformés. De plus, les plants transgéniques sont plus petits et synthétisent moins de chlorophylles dans les jeunes feuilles. Ce phénotype est probablement dû à l'utilisation massive du GGPP pour la synthèse des caroténoïdes ce qui réduit sa disponibilité pour d'autres voie métaboliques et la synthèse des gibbérellines et la chaîne phytol des chlorophylles ((FRAY *et al.*, 1995). Pour pallier à ces inconvénients, un gène d'origine bactérienne, *Crtb*, codant pour la phytoène synthétase a été introduit dans des plants de tomate (FRASER *et al.*, 2002). Le gène *Crtb* a été surexprimé uniquement dans les chromoplastes des fruits par l'utilisation du promoteur de la polygalacturonase de la tomate et la séquence d'adressage dans les chromoplastes issue de la phytoène synthétase-1 de la tomate (FRASER *et al.*, 2002). Ainsi, les fruits des plants transformés, arrivés à maturité, contiennent deux à quatre fois plus de caroténoïdes que les fruits des plants non transformés. La synthèse des autres isoprénoïdes, tocophérols, plastoquinone, ubiquinone n'est pas modifiée. La surexpression du gène *Crtb* est responsable de l'augmentation de l'activité totale de la phytoène synthétase d'un facteur 5 (codée par *Psy-1* et *Crtb*) tandis que les teneurs en caroténoïdes totaux sont seulement deux à quatre fois plus importantes. Ces résultats suggèrent que la surexpression du gène *Crtb* réduit l'importance de

l'étape catalysée par la phytoène synthétase sur le contrôle de la biosynthèse des caroténoïdes et entraîne le déplacement de l'étape limitante à un autre endroit de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes (FRASER *et al.*, 2002). ALOS *et al.* (2006) montrent que chez les agrumes, au niveau de la peau des fruits, la synthèse des chlorophylles et la synthèse des caroténoïdes semblent être coordonnées. En effet, au cours de la maturation les quantités de transcrits du gène *Dxs* varient et la valeur la plus élevée coïncide avec la plus forte valeur correspondant à la somme des teneurs en caroténoïdes totaux et des teneurs en chlorophylles. Ainsi, ces études ont montré qu'il existait une compétition entre les différentes voies de biosynthèse pour l'utilisation du GGPP et que l'expression du gène codant pour la DXS est liée à la régulation de la synthèse des caroténoïdes dans les chromoplastes. Cependant, chez les agrumes, il n'y a pas d'études sur l'expression de ce gène au niveau des sacs à jus des fruits.

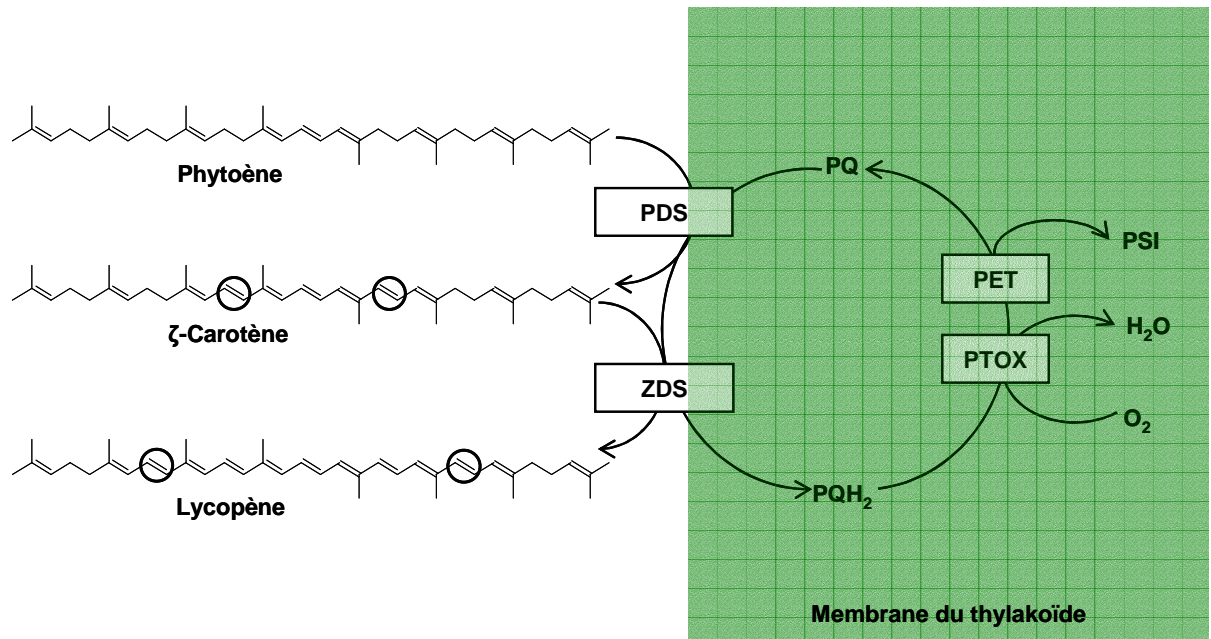
L'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des caroténoïdes et en particulier dans la formation de l'acide abscissique paraît aussi influencer l'accumulation des caroténoïdes (Figures 12. et 16.). La transformation de plants d'*Arabidopsis thaliana* avec la surexpression du gène codant pour la phytoène synthétase dans les graines a entraîné l'augmentation des teneurs en  $\beta$ -carotène avec des teneurs 43 fois plus importantes et aussi des temps de germination plus longs dus à l'augmentation concomitante des teneurs en acide abscissique (LINDGREN *et al.*, 2003). L'expression des gènes *CitNced2* et *CitNced3* (impliqués dans la formation de l'acide abscissique à partir des xanthophylles) augmente dans les sacs à jus de la mandarine Satsuma au cours de la maturation et s'accompagne de l'accumulation de l'acide abscissique (KATO *et al.*, 2006). Dans les sacs à jus de l'orange Valencia l'expression du gène *CitNced2* reste faible comme les teneurs en acide abscissique. Enfin, dans les sacs à jus du citron de Lisbonne le niveau d'expression du gène *CitNced2* augmente fortement ce qui est lié à de fortes teneurs en acide abscissique (KATO *et al.*, 2006). Ainsi, d'après ces auteurs, l'expression des gènes *CitNced* et les concentrations en caroténoïdes dans les sacs à jus seraient liées puisque l'orange est caractérisée par l'accumulation de la violaxanthine, substrat des CitNCED, et le citron par de faibles concentrations en caroténoïdes et l'absence de violaxanthine. Cependant, il existe une seule étude sur ce sujet avec l'analyse d'uniquement trois espèces d'agrumes et d'une variété par espèce. Nous manquons d'information sur les liens entre l'accumulation de violaxanthine et l'expression des *Nced* chez différentes variétés d'oranges. RODRIGO *et al.* (2006) ont analysé la synthèse des caroténoïdes dans la peau de l'orange Navelate et aussi l'expression des *Nced*. Ces auteurs ont isolé deux séquences codant pour la NCED : *CsNced1* et *CsNced2*. *CsNced1* joue un rôle dans la synthèse de l'acide abscissique dans les feuilles et les fruits tandis que *CsNced2* est spécifique des chromoplastes des fruits. Ces études sur le gène codant

pour la NCED chez les agrumes montrent la présence de plusieurs allèles pour ce gène et suggèrent l'importance du nombre de copies des gènes et des différentes formes alléliques dans la régulation de l'accumulation des caroténoïdes.

#### **1.2.4.2. Rôle du polymorphisme entre les différents allèles (modification de l'expression du gène, modification de la séquence protéique)**

La diversité des formes alléliques des gènes de biosynthèse des caroténoïdes peut avoir deux implications majeures. Les mutations peuvent affecter la régulation de l'expression du gène. Elles peuvent également conduire à la formation d'une enzyme à l'activité spécifique modifiée, voire non fonctionnelle. Nous détaillerons les études ayant isolé diverses formes alléliques impliquées dans de telles modifications en prenant d'abord l'exemple de la tomate, espèce chez laquelle de nombreux mutants sont disponibles. Nous ferons ensuite un bilan sur les travaux effectués sur les agrumes qui apportent des connaissances sur la diversité allélique des gènes de biosynthèse des caroténoïdes.

Chez la tomate, deux gènes codant pour la phytoène synthétase ont été isolés. L'un, *Psy-1*, code pour une enzyme spécifique des chromoplastes et est surexprimé au cours de la maturation des fruits tandis que l'autre code pour une enzyme spécifique des tissus photosynthétiques (BARTLEY et SCOLNIK, 1993). De même, deux gènes codant pour la lycopène  $\beta$ -cyclase (LCY-b ou CRT1-b) ont été isolés chez la tomate grâce à l'étude des mutants *Beta* (B) et *old-gold* (og) (RONEN *et al.*, 2000). Un seul gène *B* est responsable du phénotype du mutant *Beta* qui accumule du  $\beta$ -carotène à la place du lycopène. *B* code pour une lycopène  $\beta$ -cyclase dont la séquence d'acides aminés est identique à 53,2% à celle de la lycopène  $\beta$ -cyclase présente chez le type commun et à 86,1% à la séquence de la capsanthine-capsorubine synthétase du poivron. Chez le type commun, *B* est exprimé uniquement dans les chromoplastes des fleurs et des fruits et son niveau de transcription reste faible dans les fruits alors qu'il augmente fortement dans les fruits du mutant *Beta* au cours de la maturation. Le mutant *old-gold* ne synthétise pas de  $\beta$ -carotène et accumule des quantités accrues de lycopène par rapport au type commun. Ce phénotype est dû à une mutation du gène *B* qui est responsable de la formation d'une lycopène  $\beta$ -cyclase non fonctionnelle. L'étude de ces mutants a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs gènes codant pour la lycopène  $\beta$ -cyclase et l'importance des différentes formes alléliques tant pour le niveau de transcription de ces gènes que pour l'activité des enzymes correspondantes. De même, toujours chez la tomate, le phénotype du mutant *Delta* qui accumule du  $\delta$ -carotène à la place du lycopène est lié à la présence d'un allèle spécifique du gène *Lcy-e* (ou *Crt1-e*). Cet allèle



PDS, phytoène désaturase; ZDS, ζ-carotène désaturase; PQ, plastoquinone; PQH<sub>2</sub>, plastohydroquinone: plastoquinone réduite; PTOX, oxydase terminale plastidiale; PET, transporteur d'électron plastidial; PSI, photosystème I.

**Figure 17.** Mécanismes de déshydrogénation du phytoène et régénération des cofacteurs des enzymes PDS et ZDS dans les chloroplastes chez *Lycopersicum esculentum* ou *Arabidopsis thaliana*.

est responsable de l'augmentation de l'expression du gène *Lcy-e* et il diffère de l'allèle du type commun au niveau de la séquence du promoteur (RONEN *et al.*, 1999). La diversité allélique peut également affecter la fonctionnalité de l'enzyme par une modification de localisation via la modification de leur séquence d'adressage ou des protéines de transports. En effet, les enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, codées par des gènes nucléaires, sont formées dans le cytoplasme et sont ensuite transportées dans les plastes. Dans les chromoplastes des fleurs de *Narcissus pseudonarcissus*, deux formes de phytoène désaturase (PDS) ont été isolées. L'une soluble, présente dans le stroma et qui est inactive et l'autre qui est liée à la membrane et qui est active (AL-BABILI *et al.*, 1996). La phytoène désaturase qui catalyse l'introduction de deux doubles liaisons à partir du phytoène pour former le  $\zeta$ -carotène agit en présence de plastoquinone et d'un accepteur final d'électrons lié aux membranes (Figure 17). D'où l'importance de la localisation de cette enzyme pour que celle-ci soit fonctionnelle. Ceci met en évidence l'importance des différentes formes alléliques des gènes de biosynthèse pour la synthèse d'enzymes fonctionnelles et aussi l'importance des allèles des gènes codant pour des cofacteurs ou des protéines de transports.

Chez les agrumes, RODRIGO *et al.* (2003) ont étudié la composition en caroténoïdes d'un mutant de l'orange « Navelate » appelé « Pinalate ». Ce mutant accumule des carotènes (phytoène, phytofluène et  $\zeta$ -carotène) dans le flavédo des fruits à la place des xanthophylles. Ce phénotype semble être associé à la présence d'une  $\zeta$ -carotène désaturase inactive ou à un défaut d'un cofacteur de cette enzyme. Cependant, les bases moléculaires responsables de ce phénotype n'ont pas été élucidées. La localisation des enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et leur activité chez les agrumes a fait l'objet d'une récente étude (INOUE *et al.*, 2006). Ces informations sont nécessaires pour la compréhension des mécanismes de régulation. Chez les agrumes, la phytoène synthétase est partiellement liée aux membranes des plastes, la phytoène désaturase semble soluble dans le stroma, les deux lycopènes cyclases sont présentes sous deux formes : l'une soluble dans le stroma et l'autre liée aux membranes tandis la  $\beta$ -carotène hydroxylase est une protéine membranaire. Cependant ces études ont été réalisées à partir de la détermination des séquences codant pour PSY, PDS, LCY-b, LCY-e et HY-b grâce à l'extraction des ARNm du flavédo des fruits de l'orange navel et de la mandarine Satsuma. Ainsi, d'autres formes alléliques codant pour des protéines différentes peuvent être présentes dans d'autres tissus ou d'autres espèces d'agrumes. Ainsi la connaissance du nombre de copie des gènes de biosynthèse et de la variabilité allélique chez les différentes espèces d'agrumes est importante pour la compréhension des mécanismes de régulation à l'origine des différences phénotypiques au niveau interspécifique. De plus ces informations sur la variabilité allélique sont utiles pour la création de nouvelles variétés.

#### **I.2.4.3. Rôle des produits synthétisés (rétrocontrôles)**

Les études sur l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes ainsi que l'obtention de plantes génétiquement modifiées ont mis en évidence la présence de rétrocontrôles exercés par certains caroténoïdes et notamment le  $\beta$ -carotène. L'expression de la désaturase d'origine bactérienne (CRTL), qui transforme le phytoène en lycopène, dans des plants de tomates est responsable de l'obtention de fruit présentant des teneurs accrues en  $\beta$ -carotène mais, des concentrations en caroténoïdes totaux 2,5 fois plus faibles par rapport aux fruits des plants non transformés. Ce phénotype est dû à l'augmentation de l'expression de la lycopène  $\beta$ -cyclase endogène, à l'élévation des teneurs en  $\beta$ -carotène et à la diminution de l'expression du gène codant pour la phytoène synthétase. Le  $\beta$ -carotène exercerait un rétrocontrôle négatif sur *Psy* (BOTELLA-PAVIA et RODRIGUEZ-CONCEPTION, 2006).

#### **I.2.4.4. Rôle de la lumière et régulation au niveau transcriptionnel**

La lumière augmente la synthèse des caroténoïdes dans les chloroplastes des feuilles. Nous rappelons que dans les tissus chlorophylliens, les caroténoïdes jouent à la fois le rôle de pigments secondaires et de photoprotecteurs en dissipant l'excès d'énergie au niveau des chlorophylles. Dans ces conditions, les pertes en caroténoïdes sont compensées par une synthèse accrue. Cette régulation s'exerce au niveau transcriptionnel. Les quantités d'ARNm du gène *Psy* sont plus élevées dans les feuilles de tomates (GIULIANO *et al.*, 1993) ou d'*Arabidopsis thaliana* (LINTIG *et al.*, 1997) placées à la lumière. Le promoteur du gène *Psy* semble impliqué dans cette régulation (WELSCH *et al.*, 2003). En ce qui concerne les chromoplastes des fruits, la caractérisation des mutants de tomates *hp1* et *hp2* a mis en évidence l'importance de la lumière dans la synthèse des caroténoïdes dans les feuilles et les fruits. Le mutant *hp1* qui comporte plus de caroténoïdes dans les feuilles et les fruits présente une mutation au niveau d'un gène codant pour une protéine impliquée dans la transmission du signal lumineux (LIU *et al.*, 2004). Les fortes teneurs en caroténoïdes seraient liées à un nombre plus élevé de plastes et aussi à la présence de cellules de plus grandes tailles permettant un stockage plus important des caroténoïdes.

#### **I.2.4.5. Rôle des compartiments de stockage (chloroplastes, chromoplastes) et des protéines associées**

Les structures de stockage constituent aussi un mécanisme de contrôle de l'accumulation des caroténoïdes. Dans les chromoplastes, les formes de stockage des caroténoïdes sont



différentes. Chez le poivron, les caroténoïdes des fruits sont présents sous forme d'esters et sont associés à des protéines appelées fibrilline qui sont des protéines de structure et qui sont impliquées dans le stockage des caroténoïdes (DERUERE *et al.*, 1994). De plus, le gène codant pour la fibrilline est induit dans les chromoplastes et aussi dans les chloroplastes des feuilles soumises à des stress tels que le manque d'eau, le froid ou l'excès de lumière (CHEN *et al.*, 1998 ; MANAC'H et KUNTZ, 1999). Cependant, les mécanismes conduisant à l'induction de ce gène nucléaire ne sont pas encore élucidés. L'accumulation des caroténoïdes dépend des formes et structures de stockage comme le montrent également les mutants de tomates *hp1* dont la synthèse accrue des caroténoïdes est liée à l'augmentation de l'espace de stockage (LIU *et al.*, 2004). A notre connaissance, il n'existe pas d'études sur le stockage des caroténoïdes dans les chromoplastes des agrumes et sur les protéines éventuellement impliquées. Par ailleurs, l'estérification des caroténoïdes qui augmente leur caractère hydrophobe semble être efficace pour une accumulation massive de pigments.

### **I.3. PROBLÉMATIQUE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS**

Les fruits d'agrumes présentent des compositions complexes et variées en caroténoïdes. Ces compositions en caroténoïdes sont des déterminants majeurs de la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits frais et des jus. Par ailleurs, la biochimie des caroténoïdes a été étudiée et les gènes de biosynthèse sont connus. Cependant, l'origine de la diversité des compositions en caroténoïdes des jus d'agrumes reste mal comprise à ce jour. Il est d'abord nécessaire de comprendre quel est le rôle des facteurs génétiques et d'évaluer quelle part de la variabilité phénotypique est due à la diversité allélique des gènes de biosynthèse des caroténoïdes et quelle part est contrôlée par le niveau d'expression de ces mêmes gènes. La présence de différents allèles peut se traduire par des variations d'activités enzymatiques ou des variations d'expressions des gènes. Ces deux facteurs (variabilité allélique et diversité d'expression) sont deux mécanismes importants de régulation de la biosynthèse des caroténoïdes. L'analyse du polymorphisme entre les différents allèles d'un même gène de biosynthèse et de l'implication de ce polymorphisme dans la diversité phénotypique n'a fait l'objet d'aucune étude à notre connaissance chez les agrumes. Peu de travaux ont analysé la régulation au niveau transcriptionnel dans les jus d'agrumes et nous manquons encore d'information sur ce mécanisme. La compréhension des facteurs génétiques déterminant la diversité des compositions en caroténoïdes est essentielle pour l'orientation des programmes d'amélioration variétale.

Pour apporter des éléments de réponse concernant la compréhension de la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes des agrumes nous distinguons trois objectifs principaux.

1. Le premier objectif correspond à l'analyse de la diversité des compositions en caroténoïdes des fruits d'agrumes en étudiant 25 génotypes appartenant à 8 groupes différents. Etude, pour la première fois à notre connaissance, de 25 génotypes représentant les différentes espèces cultivées d'agrumes en récoltant des fruits sur des arbres issus de la même zone géographique (collection de la Station de Recherche Agronomique de San Giuliano) et soumis aux mêmes pratiques culturales. Les sous-objectifs sont : (1) étude qualitative et quantitative en analysant par HPLC les caroténoïdes dans les jus de fruits récoltés à maturité commerciale ; (2) détermination des espèces et variétés les plus intéressantes d'un point de vue organoleptique et nutritionnelle ; (3) étude de l'importance du facteur génétique ; (4) détermination des étapes clés ou des principales étapes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes potentiellement impliquées dans la diversité des compositions en caroténoïdes.

2. Le deuxième objectif concerne l'analyse de la diversité allélique des principaux gènes de biosynthèse des caroténoïdes pour les 25 génotypes appartenant au genre *Citrus* (analyse au niveau inter et intraspécifique). Cette étude est abordée par l'utilisation de marqueurs RFLP et SSR pour la détermination du nombre de copies des principaux gènes de biosynthèse et l'analyse phylogénétique des différents génotypes au niveau de ces gènes. Ces démarches seront complétées par des analyses DHPLC et *ecotilling* et par des amplifications des séquences des gènes en utilisant l'ADN génomique, clonages et séquençages.

3. Enfin, le troisième objectif correspond à l'analyse de l'expression des principaux gènes de biosynthèse des caroténoïdes. Cet objectif concerne l'étude des régulations au niveau intraspécifique en analysant le niveau d'expression des gènes par PCR en temps réel dans les sacs à jus de quatre variétés d'oranges (*C. sinensis*, cultivars Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel et Huang pi Chen) au cours de la maturation des fruits et en déterminant en parallèle les teneurs en caroténoïdes dans les jus de ces quatre génotypes. Parmi ces quatre variétés nous signalons que l'orange Cara Cara navel est un mutant de l'orange Washington navel dont la pulpe présente une coloration saumon particulière tandis que la variété Huang pi Chen est une orange dont la pulpe reste jaune pâle à maturité. Cet objectif consiste aussi à analyser les différences interspécifiques par la détermination des quantités d'ARNm des principaux gènes de biosynthèse des caroténoïdes dans les sacs à jus de trois espèces : *C. sinensis*, *C. limon*, et *C. maxima*.

## **II. MATERIELS ET METHODES**

## II.1. ANALYSES DES CAROTENOÏDES

### II.1.1. Matériel végétal

Nous avons étudié 25 génotypes appartenant au genre *Citrus* (voir Tableau 1, 1<sup>er</sup> article, chapitre III.1). Tous les fruits ont été récoltés à la Station de Recherches Agronomiques (SRA) INRA-CIRAD de San Giuliano située sur la côte orientale de la Corse. Les fruits ont été prélevés sur des arbres adultes, indemnes de maladies transmissibles connues et soumis aux mêmes conditions culturales (eau, fertilisants et traitements phytosanitaires). Pour chaque génotype, 45 fruits ont été récoltés sur 3 arbres à maturité commerciale. Les jus ont été pressés le jour même, filtrés avec un tamis de maille 1 mm et placés dans des flacons en verre ambré sous atmosphère d'azote et conservés à – 20°C. Le stade de maturité des fruits a été déterminé en utilisant les indicateurs préconisés : le pourcentage de jus, l'acidité titrable, le degré Brix et l'index de maturité (SANSON, 1986; DAVIES et ALBRIGO, 1994). L'acidité titrable a été déterminée par titrage de 5 mL de jus par une solution de soude 0,1 N pour atteindre un pH de 8,2 ; elle est exprimée en pourcentage d'acide citrique. Le degré Brix (pourcentage de solides dissous) a été mesuré par un réfractomètre calibré à 20°C. L'index de maturité a été calculé par le rapport degré Brix/acidité titrable (voir Tableau 2, 1<sup>er</sup> article, chapitre III.1).

### II.1.2. Analyse des caroténoïdes par HPLC

#### II.1.2.1. Extraction-saponification des caroténoïdes des fruits

Les caroténoïdes ont été extraits selon la méthode détaillée par DHUIQUE-MAYER *et al.* (2005) (voir 1<sup>er</sup> article, chapitre III.1). Les caroténoïdes étant des molécules sensibles à la lumière et à l'oxygène, toutes les étapes ont été conduites en lumière inactinique et les extraits transférés dans des flacons en verre ambré sous atmosphère d'azote.

Les caroténoïdes sont extraits à partir de 20 g de jus auxquels sont ajoutés 120 mg de carbonate de magnésium pour neutraliser les acides et 35 mL d'un mélange de solvants de polarités différentes : éthanol/hexane (4/3, v/v) contenant 0,1% de *ter*-butylhydroxytoluène (BHT) utilisé comme antioxydant. Un étalon interne est ajouté au jus : du lycopène (4,5 mg.L<sup>-1</sup>) ou du  $\beta$ -apo-8'-caroténal (2 mg.L<sup>-1</sup>). Le mélange est filtré sous vide avec un entonnoir en verre fritté (porosité 2). Le résidu est réextrait avec le mélange de solvant précédant puis avec 30 mL d'éthanol puis 30 mL d'hexane. Les extraits sont transférés dans une ampoule à décanter et sont lavés deux fois avec une solution de chlorure de sodium 10% et trois fois

avec de l'eau distillée. La phase organique est séparée de la phase aqueuse. Elle est séchée par l'utilisation de sulfate de sodium anhydre puis évaporée à 40°C dans un Rotavapor. Le résidu est dissout dans 500 µL de dichlorométhane et 500 µL d'un mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). Cet extrait peut être dilué jusqu'à six fois avec le mélange dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v), selon les échantillons, avant injection.

Une saponification est réalisée dans les conditions suivantes pour éviter les dégradations de caroténoïdes : les caroténoïdes étant dissous dans de l'hexane, un volume égal d'une solution d'hydroxyde de potassium méthanolique 10% est ajouté ; la réaction est réalisée pendant 14 heures dans l'obscurité, à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le mélange est ensuite transféré dans une ampoule à décanter pour une séparation de la phase hexanique et de la phase d'hydroxyde de potassium méthanolique. La phase hexanique est lavée avec de l'eau distillée à neutralité. Les caroténoïdes présents dans la phase d'hydroxyde de potassium méthanolique sont réextraits par ajout de dichlorométhane. Ces extraits sont également lavés avec de l'eau distillée à neutralité. Les extraits réunis sont séchés, filtrés et évaporés dans un Rotavapor. Le résidu est repris dans un mélange de solvants dichlorométhane/méthanol dans les proportions décrites ci-dessus.

### **II.1.2.2. Analyses chromatographiques : identification et quantification des molécules**

Les caroténoïdes ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse avec un appareil agilent 1100 system (Massy, France). Les caroténoïdes ont été séparés sur une colonne C<sub>30</sub> de caractéristiques 250 x 4,6 mm, diamètre interne 5µm YMC (Europ GMBH, Germany). La phase mobile était constituée de trois éluants : H<sub>2</sub>O comme éluant A, le méthanol comme éluant B et le MTBE comme éluant C. Le gradient d'élution est détaillé dans le 1<sup>er</sup> article, chapitre III.1. Le débit a été fixé à 1 mL.min<sup>-1</sup> et la température de la colonne à 25°C. L' HPLC était munie d'un détecteur à barrette de diodes enregistrant les signaux aux longueurs d'onde suivantes : 290 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm et 470 nm. Les chromatogrammes ont été enregistrés dans l'UV et le visible et intégrés par le logiciel Agilent Chemstation<sup>®</sup>.

Les caroténoïdes ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre d'absorption dans l'UV et le visible avec ceux de standards. Les spectres décrits dans la bibliographie et obtenus dans les mêmes conditions chromatographiques et sur le même matériel végétal ont aussi été utilisés (voir Tableau 3, 1<sup>er</sup> article, partie III.1). Les composés ont été quantifiés par détermination de courbes de calibration pour les standards disponibles :

$\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, lutéine, zéaxanthine, lycopène et  $\beta$ -apo-8'-caroténal. Les courbes de calibration ont été obtenues en utilisant 5 concentrations ; les coefficients de corrélations variaient de 0,994 à 0,998. Tous les autres caroténoïdes isolés ont été quantifiés en  $\beta$ -carotène équivalent. Pour chaque caroténoïde, l'aire a été enregistrée à 290 ou 350 ou 400 ou 450 ou 470 nm en fonction de la longueur d'onde maximum du spectre. Le rendement a été déterminé par l'ajout d'un étalon interne (lycopène ou  $\beta$ -apo-8'-caroténal) dans chaque échantillon avant extraction. Le rendement a été utilisé pour corriger les teneurs déterminées. Pour chaque caroténoïde, les concentrations sont exprimées en  $\text{mg.L}^{-1}$  et elles correspondent à la moyenne de trois valeurs. Pour un échantillon (même variété et même arbre), la séquence extraction-saponification-analyse HPLC a été répétée 3 fois. Quel que soit le composé, le coefficient de variation calculé à partir des répétitions est inférieur ou égal à 5%. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées pour les caroténoïdes dont nous disposons d'un standard à partir de séries de dilution de ce standard et de plusieurs injections de chaque point de dilution. Ces limites ont été calculées avec les équations suivantes :  $\text{LOD} = 3 \times S/a$  et  $\text{LOQ} = 10 \times S/a$  où  $S$  est l'écart type de l'ordonnée à l'origine et  $a$  le coefficient de la droite de calibration obtenue avec les points de dilution (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2003).

## II.2. ANALYSES RFLP

### II.2.1. Matériel végétal

L'ADN génomique a été extrait des feuilles de 25 génotypes appartenant au genre *Citrus* (voir Tableau 1, 2<sup>ème</sup> article, partie III.2.1.). Le protocole d'extraction est dérivé de la méthode décrite par DOYLE & DOYLE (1987). 0,5 g de tissus sont broyés dans de l'azote liquide et transférés dans un tube avec 5 mL de tampon d'extraction préchauffé à 65°C [Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1,4 M, CTAB 2% (p/v), PVP 1% (p/v) et bisulfite de sodium 0,5% (p/v)]. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 65°C pendant 20 minutes. Les tubes sont laissés 5 minutes à température ambiante puis 5 mL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) sont ajoutés. Après mélange par retournement, les tubes sont centrifugés à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et les ARN sont dégradés par ajout de RNase T1 (20 U.mg<sup>-1</sup>) et incubation une heure à 37°C. L'ADN est précipité par ajout de 5 mL d'isopropanol puis par centrifugation à 8000 rpm 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec une solution éthanol 76% (v/v)/acétate de sodium 0,2 M puis par une solution éthanol 75% (v/v)/acétate d'ammonium 10 mM. Après une centrifugation d'une minute à 10 000 rpm à 4°C, le culot est séché 5 minutes au

*SpeedVac*. L'ADN est repris dans 200  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8) ou 200  $\mu$ L d'eau ultra-pure stérile. L'ADN est quantifié par analyse de la fluorescence en utilisant le réactif de Hoechst 33258 (fluorimètre DynaQuant 200, Amersham).

### **II.2.2. Préparation des membranes**

L'ADN génomique des 25 géotypes a été digéré par trois enzymes de restriction différentes : *EcoRV*, *BamHI* et *HindIII*. Dix microgrammes d'ADN sont digérés dans un volume final de 200  $\mu$ L avec 4 unités d'enzyme par microgramme d'ADN, et le tampon correspondant 1X (Invitrogen). La solution est incubée une nuit à 37°C. Les protéines sont éliminées par ajout de 200  $\mu$ L de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et une centrifugation à 5000 rpm 15 minutes. Le surnageant est placé dans un nouveau tube stérile et l'ADN digéré est précipité par ajout de  $1/10^{\text{ème}}$  de volume d'acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est placé une demi-heure à - 20°C puis centrifugé à 8000 rpm 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70% (v/v), centrifugé à 10 000 rpm 1 minute à 4°C puis séché 5 minutes au *SpeedVac*. Le culot d'ADN est repris dans 36  $\mu$ L d'eau ultra pure stérile auxquels sont ajoutés 1/5 de volume de tampon de charge [bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), ficoll 15% (p/v)]. Une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% (p/v) est réalisée avec l'ADN digéré dans du TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) à 30 V pendant 16 heures (dimensions du gel : 20×20×0,5 cm). Le gel d'agarose est placé dans un bain de bromure d'éthidium ( $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) puis l'ADN est visualisé sous UV.

Avant le transfert de l'ADN sur membrane, le gel est placé dans un bain de dépurination (HCl 1N) pendant 10 minutes puis rincé avec de l'eau distillée. Le gel est alors placé dans un bain de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N) pendant 20 minutes puis rincé avec de l'eau distillée. L'ADN est ensuite transféré par capillarité, pendant une nuit, sur une membrane de nylon (Amersham) en utilisant la solution de dénaturation comme tampon de transfert et en suivant les recommandations du fabricant. Après transfert, la membrane est trempée dans une solution de SSC 2X (tri-citrate Na 0,02 M, NaCl 0,3 M pH 7) séchée 30 minutes à température ambiante, puis dans un four sous vide à 80°C pendant 2 heures afin de fixer l'ADN sur la membrane. Les puits du gel d'agarose ainsi que le sens de migration sont notés sur la membrane.

### **II.2.3. Préparation des sondes**

Pour la préparation des sondes, des fragments d'ADNc des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*,



*Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* ont été amplifiés par PCR en utilisant de l'ADNc de mandarine Satsuma comme matrice et des amorces définies à partir des séquences des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* disponibles dans les bases de données (numéro d'accèsion GenBank respectifs : AF220218, AB046992, AB072343, AY166796, AF315289, AB075547, AY533827) (voir Tableau 2, 2<sup>ème</sup> article, chapitre III.2.1.). Les ARN totaux ont été extraits des fruits de la mandarine Satsuma selon le protocole décrit par MANNING (1991). Après vérification de la qualité des ARN totaux d'après la méthode décrite par SAMBROOK *et al.* (1989), l'ADNc a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN totaux avec le kit *First Strand cDNA synthesis* (Fermentas). L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant un appareil *PTC-200 thermocycler* (MJ Research Inc.) dans un volume de 25 µL avec 2,5 U d'ADN Taq polymérase (Eurogentec), du tampon de réaction correspondant 1X, de l'ADNc de mandarine Satsuma 5 ng.µL<sup>-1</sup>, dNTP 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, amorces 1µM. Le programme PCR utilisé est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, 35 cycles : 94°C 30 secondes, 45-50°C 1 minute, 72°C 45 secondes puis une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Les fragments amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) dans du TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM). Les fragments ayant la taille attendue ont été récupérés et purifiés en utilisant le kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham). Avant marquage, l'identité des fragments a été vérifiée par séquençage (MWG, Martinsried, Allemagne). Les fragments purifiés ont été marqués par *random priming* avec [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP et l'utilisation du kit *Megaprime DNA Labelling System* (Amersham). Après 20 minutes à 37°C, 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8) sont ajoutés à la solution pour arrêter la réaction et augmenter le volume de la solution marquée.

**II.2.4. Hybridation des membranes****Tableau 4.** Préparation des solutions de préhybridation et d'hybridation.

Produits	Solution de préhybridation <sup>a</sup>	Solution d'hybridation
Eau ultrapure	14 mL	10 mL
Tris-HCl 1 M pH 8	1 mL	1 mL
EDTA 0.5 M pH 8	400 µL	400 µL
SSC 25X (tri-citrate Na 0,25 M, NaCl 3,75 M pH 7)	4 mL	4 mL
SDS 20%	200 µL	200 µL
Denhardt 100X [BSA 2% (p/v), Ficoll 2% (p/v), PVP 2% (p/v)]	200 µL	200 µL
ADN de saumon (dénaturé 10 min au bain-marie bouillant, 10 mg.mL <sup>-1</sup> )	200 µL	200 µL
Dextran sulfate 50%	-	4 mL

<sup>a</sup>Les volumes sont calculés pour 20 mL de solution de préhybridation et d'hybridation. Les solutions sont péchauffées à 65°C.

Les membranes sont trempées dans un bain de SSC 2X (tri-citrate Na 0,02 M, NaCl 0,3 M pH 7) avant d'être enroulées et placées dans un tube d'hybridation avec 20 mL de solution de préhybridation. Les tubes sont placés dans un four rotatif à 65°C pendant 5 heures. Puis, la solution de préhybridation est remplacée par 20 mL de solution d'hybridation auxquels ont été ajoutés les 250 µL de sonde marquée et dénaturée à 95°C 5 minutes. L'hybridation s'effectue dans le four rotatif à 65°C pendant 16 heures. Toutes les manipulations avec des solutions contenant du [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] sont réalisées derrière un écran en plexiglas. Les tubes sont également placés dans des boîtes en plexiglas.

La solution d'hybridation est jetée dans la bouteille des déchets radioactifs. Puis, les membranes sont lavées deux fois avec 80 mL de la solution de lavage 1 : SSC 0,5X et SDS 0,1% (v/v). Le deuxième lavage est réalisé dans le four à 65°C pendant 30 minutes. Une deuxième solution de lavage : SSC 0,25X et SDS 0,1% (v/v) est utilisée à 65°C pendant 30 minutes. Les solutions de lavage sont aussi placées dans la bouteille des déchets radioactifs. Les membranes, après avoir séché à l'air pendant 30 minutes sont placées dans des cassettes avec un amplificateur et un film Kodak (X-Ray film, MS Film, Kodak) et sont laissées à -80°C pendant une semaine. Les membranes sont deshybridées dans un bain contenant une solution de SDS 1% (v/v) bouillante pendant 30 minutes sous agitation. Les membranes sont

rincées une fois avec de l'eau distillée et deux fois avec une solution de SSC 2X.

### **II.2.5. Vérification de la présence de sites de restriction dans les séquences des sondes**

Pour vérifier la présence de sites de restriction des enzymes *EcoRV*, *BamHI* et *HindIII* dans les séquences d'ADN génomique correspondant aux sondes d'ADNc, nous avons utilisé les amorces précédentes (Tableau 2, 2<sup>ème</sup> article, chapitre III.2.1.) avec de l'ADN génomique de mandarine Satsuma, de pamplemousse Deep Red ou de cédrat Diamante comme matrice. L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant un appareil *PTC-200 thermocycler* (MJ Research Inc.) dans un volume de 100 µL avec 2,5 U d'ADN Taq polymérase (Eurogentec), du tampon de réaction correspondant 1X, de l'ADN génomique 5 ng.µL<sup>-1</sup>, dNTP 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, amorces 1µM. Le programme PCR utilisé est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, 35 cycles : 94°C 30 secondes, 45-50°C 1 minute, 72°C 45 secondes puis une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Dix microlitres de chaque réaction sont aliquotés et 90 µL sont digérés par *EcoRV*, *BamHI* ou *HindIII*. Avant digestion, le produit PCR est purifié grâce à l'ajout d'un volume de solution de Chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et une centrifugation du mélange à 5000 rpm 15 minutes. L'ADN génomique amplifié est digéré dans un volume final de 200 µL avec 4 unités d'enzyme par microgramme d'ADN, et le tampon correspondant 1X (Invitrogen). La solution est incubée une nuit à 37°C. Les protéines sont éliminées par ajout de 200 µL de chlorofome/alcool isoamylique (24/1, v/v) suivi d'une centrifugation à 5000 rpm 15 minutes. Le surnageant est placé dans un nouveau tube stérile et l'ADN digéré est précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est placé une demi-heure à - 20°C puis centrifugé à 8000 rpm 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70% (v/v), centrifugé à 10 000 rpm 1 minute à 4°C puis séché 5 minutes au *SpeedVac*. Le culot est repris dans 30 µL d'eau ultra-pure stérile auxquels sont ajoutés 0,2 de volume de tampon de charge [bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), ficoll 15% (p/v)]. Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) est réalisée avec l'ADN génomique non digéré et l'ADN génomique digéré dans du TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM). Le gel d'agarose est placé dans un bain de bromure d'éthidium (500 µg.L<sup>-1</sup>) puis l'ADN est visualisé sous UV.

## II.3. ANALYSES SSR

### II.3.1. Matériel végétal

Pour les analyses avec les marqueurs SSR, nous avons utilisé des aliquots des solutions d'ADN génomique obtenues à partir des feuilles de 25 géotypes lors des analyses RFLP (voir paragraphe II.2.1.).

### II.3.2. Amplification des motifs microsatellites et migration sur gel de polyacrylamide

Le mélange réactionnel est composé de 15  $\mu$ L contenant 0,8 U d'ADN Taq polymérase (Eurogentec), du tampon de réaction correspondant 1X, 10 ng d'ADN génomique, dNTP 0,2 mM,  $MgCl_2$  1,5 mM, amorces 0,2  $\mu$ M. Le programme PCR utilisé est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, 35 cycles : 94°C 30 secondes, 55-60°C 1 minute, 72°C 45 secondes puis une élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Les séquences des couples d'amorce utilisés sont présentées dans le Tableau 3, 2<sup>ème</sup> article, partie III.2.1. et dans le paragraphe matériels et méthodes du 3<sup>ème</sup> article partie III.3.1.

Les produits amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5% en conditions dénaturantes (urée 7 M ; TBE 0,5X ; acrylamide-bisacrylamide 19/1 5%). Avant le dépôt de 4  $\mu$ L d'échantillon sur le gel préchauffé par une prémigration d'une demi-heure à une puissance constante de 60 watts, les fragments amplifiés sont dénaturés en présence d'un volume de tampon de charge [98% formamide (v/v) ; 0,05% xylène cyanol (p/v) ; 0,05% bleu de bromophénol (p/v) ; 2% EDTA (v/v)] par chauffage à 94°C pendant 4 min. La migration s'effectue sous l'influence d'un champ électrique à une puissance constante de 60 watts. La durée de migration varie de 1h à 2h 30 min selon la taille des fragments attendus.

Les fragments d'ADN sont révélés par coloration au nitrate d'argent d'après une méthode adaptée de celle décrite par BEIDLER *et al.* (1982). L'ADN est fixé successivement dans un bain d'alcool à 10% (v/v) pendant 20 min puis dans un bain d'acide nitrique à 1% (v/v) pendant 5 min ; le gel est ensuite rincé dans deux bains successifs d'eau ultra pure de 10 min. La coloration est réalisée dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% (p/v) pendant 30 min. Le gel est ensuite plongé dans de l'eau ultra pure avant la révélation des bandes grâce à une solution de révélateur (30 g.L<sup>-1</sup> de carbonate de sodium additionné extemporanément de 600  $\mu$ L.L<sup>-1</sup> de formaldéhyde à 8°C). La révélation est stoppée après apparition des bandes dans un bain d'acide acétique à 5% (v/v) pendant 30 s et 3 lavages successifs à l'eau ultra pure.

## II.4 CLONAGES ET SEQUENÇAGES

### II.4.1. Matériels

Nous avons cloné les gènes *Lcy-b* et *Hy-b* chez la mandarine Satsuma (*C. unshiu*) et chez quatre variétés d'oranges (*C. sinensis*, cv. Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel et Huang pi Chen). L'ADN génomique a été extrait à partir de feuilles de ces cinq génotypes selon le protocole détaillé ci-dessus (paragraphe II.2.1.).

Le vecteur utilisé est le vecteur pCR 4-TOPO<sup>®</sup> du kit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen). Le vecteur fourni est linéarisé. Il possède une thymidine aux extrémités 3' pour permettre l'insertion des produits PCR amplifiés avec une *Taq* polymérase qui ajoute des adénines aux extrémités 3' des fragments amplifiés.

Nous avons utilisé *Escherichia coli* TOP10 comme bactéries thermocompétentes. Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani, extrait de levure 0,5% (p/v), bactotryptone 1% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0) avec un antibiotique (ampicilline ou kanamycine 50 µg.mL<sup>-1</sup>) à 37°C ou sur du LB solide (LB+agar 15 g.L<sup>-1</sup>) avec antibiotique (50 µg.mL<sup>-1</sup>).

### II.4.2. Amplification par PCR des fragments à cloner

Nous avons amplifié par PCR les séquences codantes des gènes *Lcy-b* et *Hy-b* en utilisant l'ADN génomique de cinq génotypes et des amorces spécifiques définies à partir d'un alignement des séquences disponibles pour ces deux gènes chez les *Citrus* (numéro d'accèsion GenBank AY166796, AY094582, AY644699, AF240787, AY679167, AY679168 pour *Lcy-b* et AF296158, AF315289, AB114661, AY533828, AY623047 pour *Hy-b*). Pour le gène *Lcy-b* nous avons désigné le couple d'amorces *Lcy-b\_F* 5'-ATGGATACTGTACTCAAACTCA-3' et *Lcy-b\_R* 5'-TTAATCTGTATCTTGTACCAAGTT-3' et pour le gène *Hy-b* le couple d'amorces *Hy-b\_F* 5'-ATGGCGGTCGGACTATTGGCC-3' *Hy-b\_R* 5'-TTATTTTGGGAACCCTGTTGTATG-3'. L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume de 50 µL avec 5 U d'ADN *Taq* polymérase Pfx50 (Invitrogen), du tampon de réaction correspondant 1X, de l'ADN génomique 5 ng.µL<sup>-1</sup>, dNTP 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, amorces 1µM. Le programme PCR utilisé est le suivant : dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, 35 cycles : 94°C 30 secondes, 45-50°C 1 minute, 72°C 45 secondes puis une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes.

Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) dans du TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM). Les fragments ayant la taille attendue ont été récupérés et purifiés en utilisant le kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham).

#### **II.4.3. Clonage des fragments purifiés**

**Tableau 5.** Réaction produit PCR purifié/vecteur.

Produits	Volumes
Produits PCR purifié (50 ng.µL <sup>-1</sup> )	2 µL
Solution de sels (NaCl 1,2 M, MgCl <sub>2</sub> 0,06 M)	1 µL
Eau stérile	2 µL
Vecteur TOPO	1 µL
Volume final	6 µL

Après mélange, la solution est incubée 20 minutes (produits PCR > 1 kb) puis placée à 4°C. 2 µL de cette solution sont placés dans un tube contenant les bactéries thermocompétentes. Le mélange est incubé 30 minutes dans la glace. Le choc thermique est réalisé dans un bain-marie préalablement réglé à 42°C : le mélange bactéries+vecteurs est placé à 42°C pendant 30 secondes puis est immédiatement transféré dans la glace. 250 µL de milieu SOC [extrait de levure 0,5% (p/v), bactotryptone 2% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucose 20 mM] sont ajoutés à chaque tube qui sont ensuite placés dans l'incubateur à 37°C sous agitation à 200 rpm pendant au moins une heure. 50 µL issus de la transformation précédente sont étalés sur un milieu sélectif (LB solide contenant de l'ampicilline et préalablement chauffé à 37°C pendant 30 minutes). Après 5 minutes, les boîtes sont retournées et placées à 37°C pendant une nuit. Les colonies sont sélectionnées et remises en culture dans 2 mL de LB avec de l'ampicilline (50 µg.mL<sup>-1</sup>) à 37°C sous agitation à 200 rpm pendant une nuit.

#### **II.4.4. Extraction des plasmides et vérification de l'identité des fragments clonés par PCR**

Les plasmides ont été extraits d'après la méthode décrite par SAMBROOK *et al.* (1989). Brièvement, 1,5 mL contenant les bactéries transformées sont centrifugés à 15 000 rpm 30 secondes à 4°C. Le culot est repris dans 100 µL de solution de lyse I (glucose 50 mM, tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) à 4°C. Après mélange, 200 µL de solution de lyse II

[NaOH 0,2 N, SDS 1% (v/v)] à 4°C sont ajoutés et les solutions sont homogénéisées. 150 µL de solution de lyse III [acétate de potassium 5M, acide acétique glacial 11,5% (v/v)] à 4°C sont ajoutés puis les tubes sont incubés 5 minutes dans la glace. Les tubes sont centrifugés à 14 000 rpm 5 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube stérile contenant 1 volume de solution phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v). Après mélange, les solutions sont centrifugées à 14 000 rpm 2 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et l'ADN est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu, incubation des tubes à -20°C 30 minutes et centrifugation à 14 000 rpm 5 minutes à 4°C. Les culots sont lavés avec de l'éthanol 70% (v/v). Après centrifugation à 14 000 rpm 1 minute, les culots sont séchés 5 minutes au *SpeedVac*. Les culots sont ensuite dissous dans 50 µL d'eau ultrapure stérile. Le séquençage a été réalisé par MWG BIOTECH (Martinsried, Allemagne) à partir des plasmides purifiés.

La vérification de l'identité des fragments clonés a été réalisée par PCR en utilisant les mêmes conditions et les mêmes amorces que celles décrites dans le paragraphe II.4.2. et les plasmides purifiés comme matrice.

## II.5. DIVERSITE ALLELIQUE DU GENE *Lcy-b*, ANALYSES DHPLC

Nous avons analysé la variabilité de la séquence codante du gène *Lcy-b* par analyses DHPLC selon la méthode décrite par OEFNER et UNDERHILL (1998). Pour amplifier l'ensemble de la séquence codante et pour obtenir des fragments de taille comprise entre 300 et 500 pb, nous avons défini quatre couples d'amorces sur les zones conservées à partir d'un alignement des séquences codantes du gène *Lcy-b* disponibles dans les bases de données. Les séquences de ces amorces sont détaillées dans le Tableau 6. Pour chacun des 25 génotypes, quatre amplicons ont ainsi été analysés.

**Tableau 6.** Couples d'amorces définis pour les analyses DHPLC

Amorce	Séquence	Taille de l'amplicon
Lcyb_1D_forward	5'-ATGGATACTGTACTCAAACTCA-3'	391 pb
Lcyb_1D_reverse	5'-CATCCACCCAAACACCATAAT-3'	
Lcyb_2D_forward	5'-ATTATGGTGTGTTGGGTGGATG-3'	460 pb
Lcyb_2D_reverse	5'-CCTCTTTGAGCTCCGAATTGT-3'	
Lcyb_3D_forward	5'-ACAATTCGGAGCTCAAAGAGG-3'	427 pb
Lcyb_3D_reverse	5'-CCTTTCTATGGGCCACAAATC-3'	
Lcyb_4D_forward	5'-AATTGTGGGCCATAGAAAGC-3'	290 pb
Lcyb_4D_reverse	5'-TTAATCTGTATCTTGTACCAAGTT-3'	

Les fragments amplifiés sont dénaturés puis on laisse les brins se réappairier entre eux. Ces molécules ont été séparées sur une colonne de chromatographie en conditions dénaturantes. Les brins sont relargués de la colonne d'autant plus vite qu'ils sont moins stables. Ainsi, les hétéroduplex sont libérés les premiers (le mauvais appariement entraîne une instabilité), puis les homoduplex de l'allèle le plus riche en TA (la liaison T-A ne possède que deux ponts Hydrogène) et enfin les homoduplex de l'allèle le plus riche en GC (la liaison C-G possède trois ponts Hydrogène). A chaque libération, un pic est enregistré sur la courbe finale. Les amplicons ont été analysés à trois températures, 57, 58 et 60°C.

## II.6. PCR EN TEMPS REEL

### II.6.1 Matériel végétal

Les fruits de six géotypes [quatre variétés d'oranges (*C. sinensis*), le citron Eureka (*C. limon*) et le pamplemousse Deep Red (*C. maxima*)] ont été récoltés à trois stades de développement au cours de la période 2005-2006. Les trois stades de développement sont décrits dans le Tableau 7.

**Tableau 7.** Stades de développement des fruits récoltés.

Géotype	Diamètre moyen (cm)±ET <sup>a</sup>		
	Août	Novembre	Février
Orange Shamouti	4,7±0,2	7,0±0,3	7,2±0,6
Orange Sanguinelli	4,9±0,4	5,4±0,1	6,2±0,1
Orange Cara Cara	5,7±0,2	8,4±0,5	8,6±0,4
Orange Huang pi Chen	5,1±0,2	7,2±0,4	8,3±0,3
Citron Eureka	3,4±0,1	4,8±0,1	5,4±0,2
Pamplemousse Deep Red	11,6±0,2	12,3±0,4	12,6±0,3

<sup>a</sup>moyenne pour 15 fruits ± ET, écart type.

La pulpe des fruits a été immédiatement congelée dans l'azote liquide et conservée à – 80°C. Les ARN totaux ont été extraits des sacs à jus des fruits d'après une méthode dérivée de celle décrite par MANNING (1991). Brièvement, une lyse des cellules est réalisée par le broyage dans l'azote liquide de la pulpe des fruits et le mélange d'un volume de poudre obtenue dans deux volumes de tampon d'extraction [Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM, SDS 1% (v/v)] et un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v) à pH 7. L'utilisation de phénol saturé en eau permet la séparation des acides nucléiques et des protéines qui présentent des solubilités différentes dans les solvants polaires. Le



mélange précédent est centrifugé 10 minutes à 5000 rpm à 4°C ; les ARN sont présents dans la phase aqueuse tandis que les protéines précipitent à l'interface solvant/eau. Ainsi, le surnageant est placé dans un nouveau tube contenant un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v). Le mélange est centrifugé 10 minutes à 5000 rpm à 4°C et le surnageant est prélevé et placé dans un nouveau tube. Les polysaccharides sont éliminés par ajout de 0,2 volume d'acétate de sodium 3 M, 0,25 volume d'éthanol absolu et 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et par centrifugation 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le surnageant est une nouvelle fois lavé par l'ajout d'un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et par centrifugation 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Puis, les ARN présents dans la phase aqueuse sont précipités par ajout d'un volume de chlorure de lithium 4 M et incubation une nuit à 4°C. Après centrifugation d'une heure à 14 000 rpm à 4°C, le culot est lavé à l'éthanol 70% (v/v) puis repris dans 1,5 mL d'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate). Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v) est ajouté et le mélange est centrifugé 10 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant est placé dans un nouveau tube contenant un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et le mélange est centrifugé 10 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Après récupération du surnageant, les ARN sont précipités par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol absolu. Après incubation d'une heure à - 20°C, la solution est centrifugée 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le culot est lavé avec une solution d'éthanol 70 % (v/v), séché puis repris dans 100 µl d'eau DEPC. Les ARN extraits sont conservés à - 80°C. Les ARN sont ensuite purifiés par l'utilisation d'une DNase I du kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) selon la méthode recommandée par le fabricant. La qualité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1,2 % (p/v) suivie d'une visualisation sous lumière UV d'après le protocole de SAMBROOK *et al.* (1989).

### **II.6.2. Définition des amorces**

Les amorces utilisées pour l'amplification spécifique des ADNc des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* sont présentées dans le Tableau 3, 3<sup>ème</sup> article, partie III.3.1. Ces amorces ont été définies à partir des alignements des séquences codantes de ces gènes qui ont été isolées à partir des fruits d'agrumes et qui sont disponibles dans les bases de données. Le logiciel BioEdit version 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), programme clustalW alignement multiple, a été utilisé pour l'alignement des séquences et le logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) pour la définition des amorces avec les conditions suivantes :

- taille de l'amplicon 50-150 pb ;

- taille des amorces minimum 19, optimum 20, maximum 21 ;
- T<sub>m</sub> minimum 59, optimum 60, maximum 61 ;
- pourcentage de GC minimum 45%, optimum 50%, maximum 55% ;
- pas plus de 3 G consécutifs ;
- les 5 derniers nucléotides ne doivent pas comporter plus de 2 G ou C consécutifs.

### **II.6.3. Quantification des ARN totaux**

Les ARN totaux ont été quantifiés par fluorimétrie avec l'utilisation du RiboGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Seul le complexe ARN-RiboGreen émet de la fluorescence (émission maximum à 520 nm). Ainsi, le dosage n'est pas faussé par la présence de protéines ou de nucléotides libres provenant d'ARN ou ADN dégradés. Cette méthode permet de mesurer des concentrations d'ARN comprises entre 1 ng.mL<sup>-1</sup> et 1 µg.mL<sup>-1</sup>.

### **II.6.4. Réaction de PCR en temps réel**

Un appareil LightCycler 2.0 (Roche) muni du logiciel LightCycler 4.0<sup>®</sup> a été utilisé. La réaction est réalisée à partir de 50 ng d'ARN totaux dans un volume de 10 µL contenant 2,5 unités Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1 unité RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 2 µL LC FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche) et 2,5 µM de chaque amorce. La *reverse transcription* (RT) est réalisée à 48°C 30 minutes. Après une dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, les séquences d'ADNc sont amplifiées d'après le programme détaillé dans le Tableau 8.

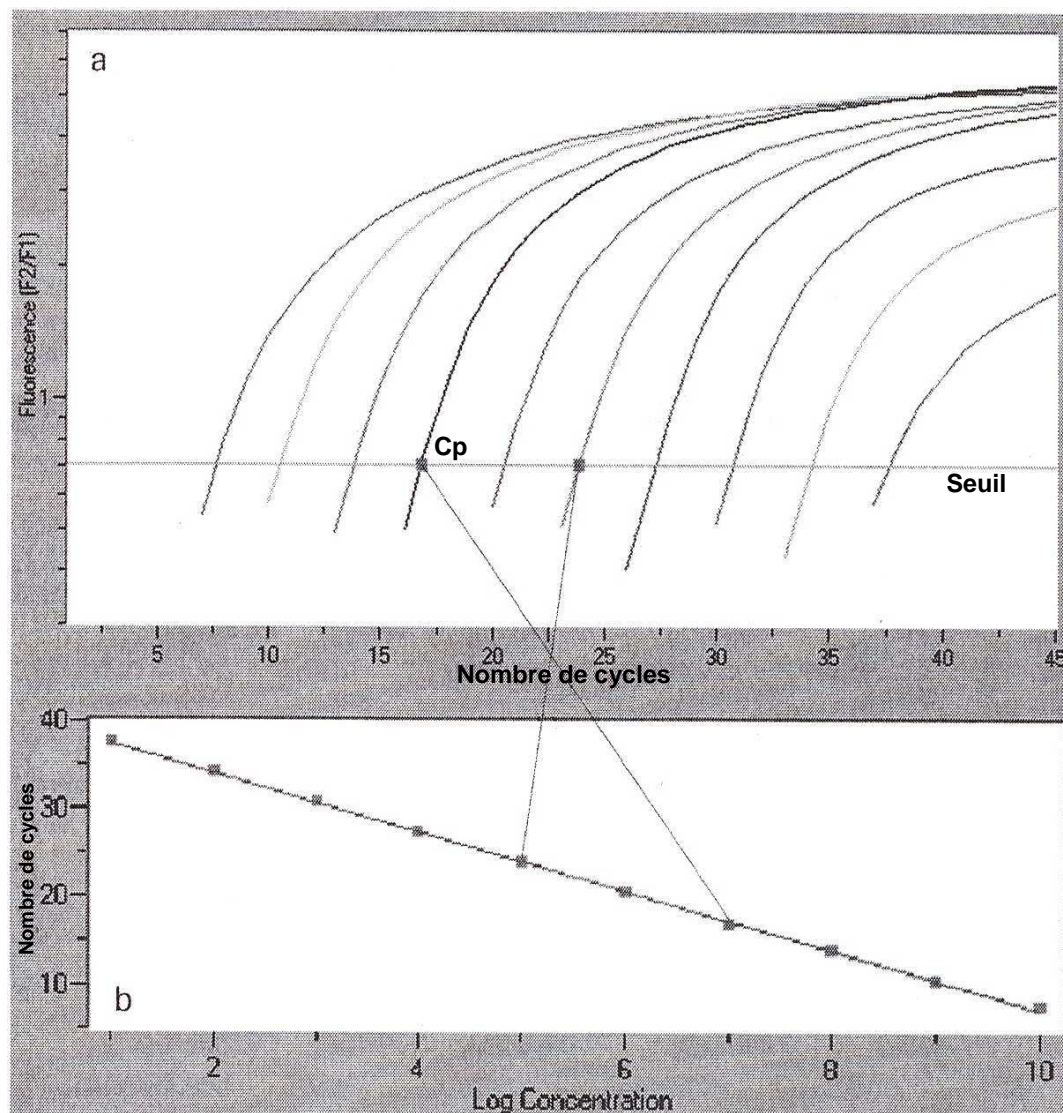
**Tableau 8.** Etapes du programme de PCR en temps réel.

	Température	Durée	Nombre de cycles
RT	48°C	30 min	1
Dénaturation	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	2 s	45
Appariement	60°C	10 s	
Elongation	72°C	15 s	
Fusion	95°C	15 s	1
	42°C	1 min	
	95°C	0 s	
Refroidissement	40°C	20 s	1

L'intensité de la fluorescence émise par le SyBr Green, intercalant de l'ADN double brin, est enregistrée durant la phase d'élongation à 72°C. La spécificité de l'amplification est illustrée par la courbe de fusion de l'amplicon d'un gène d'intérêt. Cette courbe est formée à partir de la décroissance de la fluorescence du SyBr Green au fur et à mesure de son décrochage de l'ADN lors de la montée en température. Au point de fusion, les deux brins d'ADN sont séparés et la fluorescence diminue rapidement. La courbe de fusion d'un amplicon dépend de sa composition en nucléotides et de sa longueur. Tous les produits PCR amplifiés avec le même couple d'amorces doivent avoir la même température de fusion. Ainsi, si l'amplification est spécifique, un seul pic apparaît sur la courbe de fusion. Des pics supplémentaires peuvent être présents si la réaction n'est pas spécifique ou dans le cas de la formation de dimères d'amorces puisque le SyBr Green se lie à tout ADN double brin d'où l'importance de la définition des amorces.

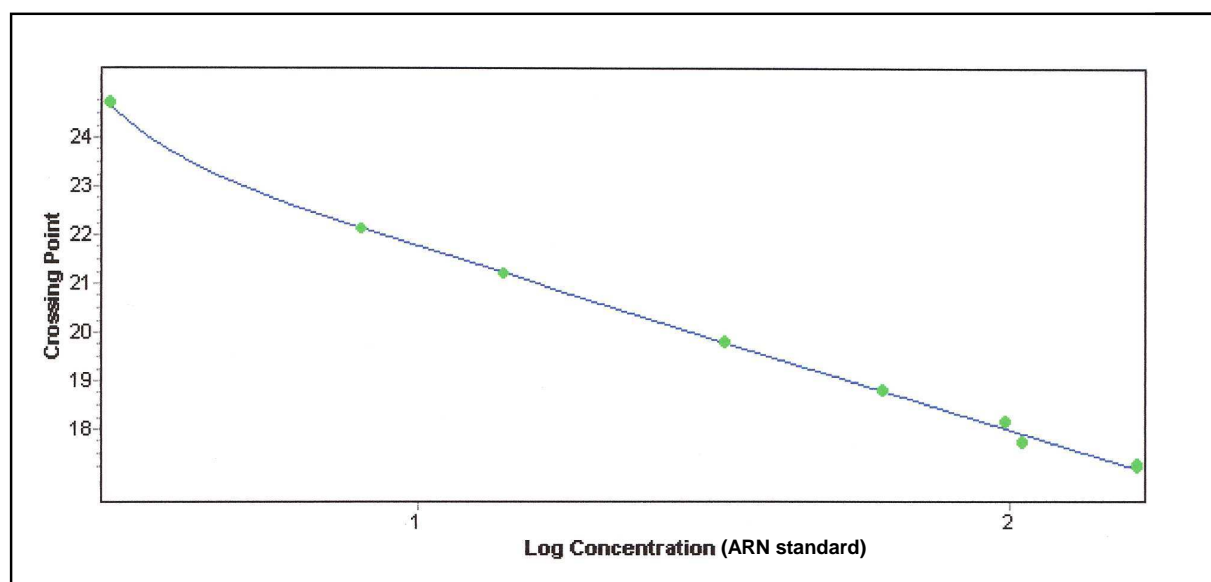
#### **II.6.5. Quantification relative des ARNm**

L'appareil LightCycler permet d'analyser l'augmentation de la fluorescence (liée à l'augmentation de la quantité d'ADN) lors de la phase exponentielle de la PCR c'est-à-dire lorsqu'il y a une relation linéaire entre le log de la quantité d'ADN et le nombre de cycles. Le logiciel mesure le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau de fluorescence fixé ou seuil. L'intersection entre ce seuil et la courbe de la réaction PCR (fluorescence en fonction du nombre de cycles) est appelée *crossing point* (cp). Plus les concentrations initiales en ARN ou ADN sont faibles et plus la valeur cp sera grande. La Figure 18 illustre la relation entre cp et le log de la concentration en ADN.



**Figure 18.** Détermination des *crossing points* (a) et relation entre cp et log de la concentration en ADN (b).

Nous avons quantifié les ARNm par l'obtention d'une courbe de calibration. Un échantillon de même nature que les échantillons à analyser (ARN totaux extraits de la pulpe des fruits) de concentration connue est utilisé pour obtenir cette courbe de calibration en réalisant 10 points de dilution de cet échantillon et en utilisant les mêmes amorces et mêmes conditions PCR que pour les échantillons à analyser. Un exemple de courbe de calibration obtenu pour le gène *Hy-b* (valeurs cp en fonction du log de la concentration en ARN) est présenté dans la Figure 19.



**Figure 19.** Courbe de calibration pour le gène *Hy-b* obtenue à partir d'une série de dilutions d'un standard.

Les valeurs cp des échantillons à analyser sont déterminées en fonction de cette courbe de calibration ainsi que les quantités relatives d'ARNm dans les échantillons analysés. Ces valeurs sont ensuite divisées par la quantité initiale d'ARN totaux dans les échantillons mesurée précisément avec du RiboGreen d'après la méthode décrite par ALOS *et al.* (2006) ce qui permet d'obtenir une bonne répétabilité des analyses. Chaque échantillon a été analysé au moins trois fois.

## II.7. ANALYSES STATISTIQUES

### II.7.1. Analyse de variance

Nous avons réalisé des analyses de variance à un facteur (facteur génotype) pour comparer les 25 variétés d'agrumes sur la base des teneurs en caroténoïdes (variables quantitatives) exprimées en  $\text{mg.L}^{-1}$ . L'analyse de variance à un facteur n'est autre que la comparaison des moyennes de plusieurs échantillons ou génotypes. L'objectif de ces analyses était de déterminer la contribution du facteur génotype à la variance pour chaque caroténoïde. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc. 1989).

Nous avons également réalisé des analyses de variance à deux facteurs (facteur génotype et facteur stade de développement) pour comparer les six génotypes étudiés lors des analyses en PCR en temps réel sur la base des quantités relatives en ARNm pour chacun des sept gènes de biosynthèse des caroténoïdes (variables quantitatives). Ces analyses ont également été

réalisées avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc. 1989). Le test de Scheffé a été utilisé pour classer ces six génotypes.

### **II.7.2. Classification automatique**

Nous avons utilisé la méthode Neighbor-joining pour classer les 25 génotypes sur la base des compositions en caroténoïdes et le logiciel @DARwin 4.0 (CIRAD Montpellier, France). Le premier dendrogramme a été construit avec le calcul des dissimilarités avec l'indice de Dice en prenant en compte la présence/absence des 25 caroténoïdes utilisés comme variables (voir Figure 1, 1<sup>er</sup> article, partie III.1.). Le deuxième dendrogramme a été obtenu sur la base des concentrations en caroténoïdes et le calcul des dissimilarités avec la détermination des distances Euclidiennes (voir Figure 2, 1<sup>er</sup> article, partie III.1.).

Indice de Dice :  $D(i, j) = (b + c)/(2a + b + c)$

a est le nombre de caroténoïdes commun chez les individus i et j ;

b est le nombre de caroténoïdes présents chez i et absents chez j ;

c est le nombre de caroténoïdes absents chez i et présents chez j ;

d est le nombre de caroténoïdes absents chez i et j.

Distances euclidiennes :  $D(i, j) = (\sum_1^k (x_{ik} - x_{jk})^2)^{1/2}$

$x_{ik}$  et  $x_{jk}$  sont les concentrations du caroténoïde k respectivement pour les individus i et j.

Pour classer les 25 génotypes et construire des dendrogrammes sur la base de la présence/absence des fragments obtenus avec les marqueurs RFLP et SSR, nous avons utilisé la méthode Neighbor-joining et l'indice de Dice pour le calcul de dissimilarités (voir Figures 3, 5 et 6, 2<sup>ème</sup> article, partie III.2.1.).

Nous avons également construit un arbre phylogénétique à partir des résultats des analyses DHPLC sur la base d'une matrice individus/amplicons en utilisant une classification hiérarchique ascendante, l'indice de Sokal et Michener et le logiciel @DARwin 4.0 (voir Figure 20 partie III.2.2.).

**Indice de Sokal et Michener :  $D(i, j) = u/(m + u)$**

m est le nombre de caractères identiques chez i et j ;

u est le nombre de caractères différents chez i et j.

Nous avons classé les séquences du gène *Lcy-b* avec le logiciel @DARwin 5.0 (CIRAD Montpellier, France) en utilisant une classification hiérarchique ascendante et l'indice de Kimura (voir Figure 21 partie III.2.2 et Figure 25 partie III.3.2.)

**Indice de Kimura :  $D(i, j) = \frac{1}{2} \ln (1 - 2u_s/L - u_v/L) - \frac{1}{4} \ln (1 - 2u_v/L)$**

$u_s$  est le nombre de transitions ;

$u_v$  est le nombre de transversions ;

$u = u_s + u_v$  est le nombre de sites différents chez i et j ;

m est le nombre de sites identiques chez i et j ;

$L = u + m$  est le nombre de sites conservés chez i et j.

### **II.7.3. Analyse en composantes principales**

Nous avons utilisé l'analyse en composantes principales pour étudier les liens entre les données sur l'expression des sept gènes de biosynthèse, les teneurs en caroténoïdes (17 variables quantitatives) et les quatre variétés d'oranges (4 individus). L'analyse en composantes principales consiste à trouver un espace de dimension réduite (dim = 1, 2 ou 3) sur lequel seront projetées ces 17 variables. L'espace réduit est obtenu à partir des composantes principales ou axes principaux qui sont des combinaisons linéaires des variables initiales. L'espace réduit doit être choisi de sorte à avoir une information maximale ou une dispersion maximale (variance maximale). Les deux premiers axes qui ont été déterminés expliquent 87,16% de l'information (voir Figure 5, 3<sup>ème</sup> article, partie III.3.). L'analyse en composantes principales a été réalisée avec le logiciel XLStat (Addinsoft) à partir de la matrice des corrélations.

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**



### **III.1. STRUCTURATION DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE EN RELATION AVEC L'HISTOIRE DES AGRUMES**

Les agrumes ont des compositions complexes en caroténoïdes : plus de 100 molécules différentes ont été isolées dans les fruits. Les travaux sur les caroténoïdes des jus d'agrumes suggèrent l'importance du facteur variétal dans la diversité des compositions en caroténoïdes. Cependant, ces travaux se sont surtout focalisés sur les oranges, les mandarines ou les pomelos et portent sur un petit nombre de variétés. De plus la comparaison des données issues de ces études est difficile étant données les différentes méthodes d'analyse utilisées ou encore la diversité de l'origine géographique des fruits étudiés, la variation de la composante environnementale pouvant entraîner des différences importantes de compositions en caroténoïdes. Ainsi, nous manquons de données sur le rôle du facteur génétique dans la diversité des compositions en caroténoïdes des agrumes, sur la variabilité interspécifique et intraspécifique et sur l'organisation de cette diversité.

Titre : La diversité des compositions en caroténoïdes au sein du genre *Citrus* est fortement influencée par les facteurs génétiques.

#### **III.1.1. Résumé**

L'objectif de cette étude est d'analyser la structuration de la diversité des compositions en caroténoïdes dans les fruits des agrumes cultivés et d'évaluer le rôle du facteur génétique. Nous avons étudié les compositions en caroténoïdes des fruits de 25 génotypes représentant les 8 espèces d'agrumes cultivées. Les fruits ont été récoltés sur des arbres, de la collection INRA-CIRAD de la Station de Recherches Agronomiques de San Giuliano, soumis aux mêmes pratiques culturales. Pour chaque variété, 45 fruits ont été prélevés sur trois arbres issus de multiplication végétative par greffage (clones). Les caroténoïdes des jus de ces 25 génotypes ont été analysés par HPLC en utilisant un appareil Agilent 1100, muni d'une colonne C<sub>30</sub> et d'un détecteur à barrette de diodes. Les caroténoïdes ont été identifiés par l'utilisation des temps de rétention, des caractéristiques spectrales et de co-injections avec des standards. Les caroténoïdes ont été quantifiés par la réalisation de courbes de calibration avec le  $\beta$ -carotène, la  $\beta$ -cryptoxanthine, la lutéine, le lycopène et le  $\beta$ -apo-8'-caroténal avec pour chaque étalon cinq

points de dilution. Deux arbres montrant les distances entre les génotypes ont été construits à partir de la présence / absence des caroténoïdes ou des concentrations en composés en utilisant la méthode Neighbor-Joining. Le facteur génétique joue un rôle essentiel dans la structuration de la variabilité des profils en caroténoïdes lorsque les autres facteurs comme la zone géographique ou les pratiques culturales sont minimisés. Sur la base de la présence/absence des composés nous avons classé les génotypes en trois groupes. Cette classification des 25 génotypes, appartenant aux huit espèces d'agrumes cultivées, est en accord avec les classifications établies précédemment avec des marqueurs moléculaires neutres. Ces résultats suggèrent que le processus global d'évolution des agrumes est le principal facteur d'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes. Ils nous permettent de proposer les étapes de la chaîne de biosynthèse responsables de la structuration de la diversité des teneurs en caroténoïdes chez les agrumes cultivés. Enfin, nous discutons des mécanismes de régulations pouvant contrôler ces étapes clés.

### **III.1.2. Article**

Titre: Carotenoid Diversity in Cultivated *Citrus* is Highly Influenced by Genetic Factors.

FANCIULLINO, A. L.; DHUIQUE-MAYER, C.; LURO, F.; CASANOVA, J.; MORILLON, R.;  
OLLITRAULT, P.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, p. 4397-4406.

## Carotenoid Diversity in Cultivated Citrus Is Highly Influenced by Genetic Factors

ANNE-LAURE FANCIULLINO,<sup>†</sup> CLAUDIE DHUIQUE-MAYER,<sup>\*,‡</sup> FRANCOIS LURO,<sup>‡</sup>  
JOSEPH CASANOVA,<sup>§</sup> RAPHAEL MORILLON,<sup>†</sup> AND PATRICK OLLITRAULT<sup>†</sup>

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),  
Département FLHOR, TA50/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France; Institut National de Recherche  
Agronomique (INRA) UR GEQA Site de San Giuliano, F-20230 San Giuliano, France; and Université  
de Corse, Equipe Chimie et Biomasse, UMR CNRS 6134, Route des Sanguinaires,  
F-20000 Ajaccio, France

*Citrus* fruits are complex sources of carotenoids with more than 100 kinds of pigments reported in this genus. To understand the origin of the diversity of carotenoid compositions of citrus fruit, 25 genotypes that belong to the 8 cultivated *Citrus* species were analyzed. Juice extracts of mature fruit were analyzed by high-performance liquid chromatography using a C<sub>30</sub> column. The 25 citrus genotypes presented different carotenoid profiles with 25 distinct compounds isolated. Statistical analyses revealed a strong impact of genotype on carotenoid compositions. Two kinds of classifications of genotypes were performed: on qualitative data and on quantitative data, respectively. The results showed that variability in carotenoid compositions was more interspecific than intraspecific. Two carotenoids, *cis*-violaxanthin and the  $\beta$ -cryptoxanthin, strongly determined the classification on qualitative data, which was also in agreement with previous citrus variety classifications. These findings provide evidence that, as for other phenotypical traits, the general evolution of cultivated *Citrus* is the main factor of the organization of carotenoid diversity among citrus varieties. To the authors' knowledge this is the first study that links the diversity of carotenoid composition to the citrus genetic diversity. These results lead to the proposed major biosynthetic steps involved in the differential carotenoid accumulation. Possible regulation mechanisms are also discussed.

**KEYWORDS:** *Citrus*; carotenoids; HPLC analysis; juice composition; biosynthesis regulation; citrus phylogeny

### INTRODUCTION

Carotenoids are major components in *Citrus* juice quality. External and juice colors are mainly due to the presence of these pigments. Carotenoids of *Citrus* juices are also involved in the prevention of chronic diseases such as certain cancers (1), probably because of their antioxidant properties (2-4). In addition, with more than 100 different kinds of carotenoids isolated in *Citrus*, citrus fruits are complex sources of carotenoids (5).

The carotenoid composition of citrus juices has been widely investigated. It has been demonstrated that the carotenoid composition of citrus juices was influenced by several factors such as the growing conditions (5), the geographical origin (6), the fruit maturity (7), and particularly the citrus variety (8-12). Concerning this last factor, Kato et al. (11) showed that mandarin and orange juices accumulated high contents of several carotenoids (violaxanthin, lutein, zeaxanthin, and  $\beta$ -

cryptoxanthin), whereas lemon juice was poor in these components. Goodner et al. (10) demonstrated that mandarins, oranges, and their hybrids were quite distinct because of their  $\beta$ -cryptoxanthin contents. Juices of red grapefruits contained two major carotenoids: lycopene and  $\beta$ -carotene (12). Despite the carotenoid composition of some citrus varieties today being well characterized, the origin of this diversity is still not well understood. Only a few studies have compared the carotenoid composition of citrus varieties that belong to different citrus species. Consequently, very little is known about relationships between carotenoid biosynthesis and citrus genetic diversity. Further investigations dealing with genetic determinism of carotenoid content diversity in the *Citrus* genus are required to be able to manage these traits in citrus-breeding programs.

At the biochemistry level, carotenoid biosynthesis is now well established (13, 14). Carotenoids are synthesized in plastids by enzymes that are nuclear encoded (14). The C<sub>40</sub>-carotenoid skeleton is formed by the condensation of two molecules of the C<sub>20</sub>-precursor geranylgeranyl diphosphate (GGDP) to produce the colorless 15-*cis* phytoene under the action of the phytoene synthase (PSY) enzyme. Then, in plants, two enzymes, phytoene desaturase (PDS) and  $\zeta$ -carotene desaturase (ZDS), catalyze four consecutive desaturation steps to convert phytoene into the red lycopene. Recently, Isaacson et al. (15) and Park et al. (16) have

\* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33-(0)467614482; fax +33(0)467614433; e-mail claudie.dhuique-mayer@cirad.fr].

<sup>†</sup> Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

<sup>‡</sup> INRA Unité GEQA.

<sup>§</sup> Université de Corse, Equipe Chimie et Biomasse.

isolated the gene that encodes the carotenoid isomerase (CRTISO), which catalyzes the isomerization of polycis-carotenoids to *all-trans*-carotenoids. Cyclization of lycopene is a branching point: one branch leads to  $\beta$ -carotene and the other to  $\beta$ -carotene. The lycopene  $\beta$ -cyclase (LCY-b) then converts lycopene into  $\beta$ -carotene in two steps, whereas the formation of  $\beta$ -carotene requires the action of two enzymes, lycopene  $\varepsilon$ -cyclase (LCY-e) and LCY-b (17).  $\beta$ -Carotene is converted into lutein by hydroxylations catalyzed by  $\varepsilon$ -carotene hydroxylase (HY-e) and  $\beta$ -carotene hydroxylase (HY-b). Other xanthophylls are produced from  $\beta$ -carotene with reactions of hydroxylations catalyzed by HY-b and epoxidation catalyzed by zeaxanthin epoxidase (ZEP). The carotenoid biosynthetic pathway has been known for a long time, but just a few studies have investigated the regulation of carotenoid biosynthesis in *Citrus* (18-21). It is worth noting that these works have been focused on the regulation of carotenoid biosynthesis during citrus fruit maturation. Thus, we should improve our understanding of regulation mechanisms involved in the variability of carotenoid composition of mature citrus fruits. It is important to identify which part of the diversity is related to the allelic diversity of the genes involved in biosynthetic pathway and which one is due to a diversification of the regulation.

The origin and evolution of cultivated *Citrus* have been widely investigated by numerical taxonomy based on morphological characters (22, 23) and molecular marker analyses (24- 27). Strong correlations have been found between phenotypical and molecular organization diversity at the interspecific level. Generalized linkage disequilibrium has resulted from the evolutive story of cultivated *Citrus* (26). All authors have agreed to the existence of three major basic taxa from which originated all of the cultivated forms: *Citrus medica* (citrons), *Citrus reticulata* (mandarins), and *Citrus maxima* (pummelos). The global linkage disequilibrium may be the result of an initial allopatric evolution of these three taxa and a further limitation of sexual recombination, probably due to the predominant apomixy of most varieties. *C. medica* is originated from an area covering northeastern India, Burma, and western China; *C. reticulata* from Vietnam, southern China, and Japan; and *C. maxima* from the tropical region of Malaysia and Indonesia (28, 29). At the intraspecific level phenotypic diversity may have resulted from mutational events combined with sexual recombinations for the basic taxa (*C. medica* and *C. maxima* particularly). Only mutational events have been involved in the diversification of secondary species such as *C. sinensis* or *C. paradisi* (26). Combined with human selection and clonal multiplication, mutational events may have produced a high level of phenotypic diversity, whereas global genetic diversity analyzed with molecular markers has remained very low or negative. This was particularly true for *C. sinensis*. With regard to the carotenoid contents, which are clearly associated with the visual attractiveness of fruit, one may suppose that human selection has been an important factor in diversification process.

The objective of this paper is to analyze the organization of the diversity of carotenoid content in the *Citrus* genus in order (i) to evaluate how this organization is related, on the one hand, to the global structuration resulting from the origin of cultivated forms and, on the other hand, to more recent mutation/selection processes; (ii) to try to identify the key steps of the biosynthetic pathway involved in this organization by a stop of the pathway or by a differential level of activity; and (iii) at the end to establish potential links between the evolution of cultivated

*Citrus* and the functionality of key steps of the biosynthetic

**Table 1.** Genotypes Used for Juice Preparation

no.	common name	Tanaka system	ICVN no. <sup>a</sup>
1	Willowleaf mandarin	<i>C. deliciosa</i> Ten.	0100133
2	Wase Satsuma	<i>C. unshiu</i> Marc.	0100230
3	Hansen mandarin	<i>C. reticulata</i> Blanco	0100357
4	Seedless pummelo	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	0100710
5	Deep Red pummelo	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	0100757
6	Chandler pummelo	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	0100608
7	Etrog citron	<i>C. limonimeditica</i> L.	0100130
8	Diamante citron	<i>C. medica</i> L.	0100540
9	Marsh grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf.	0100188
10	Star Ruby grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf.	0100293
11	Ray Ruby grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf.	0100604
12	Shamouti orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100299
13	Sanguinelli orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100243
14	Cara Cara navel orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100666
15	Huang pi Chen orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100567
16	Maroc sour orange	<i>C. aurantium</i> L.	0110033
17	Bouquetier de Nice	<i>C. aurantium</i> L.	0100688
18	Myrtle-leaf orange	<i>C. myrtifolia</i> Raf.	0100708
19	Eureka Frost lemon	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	0100004
20	Volkamer lemon	<i>C. limonia</i> Osbeck	0100729
21	Meyer lemon	<i>C. meyeri</i> Yu. Tan.	0100549
22	Rangpur lime	<i>C. limonia</i> Osbeck	0110050
23	Mexican lime	<i>C. aurantiifolia</i> (Christm.) Swing.	0100140
24	Palestine sweet lime	<i>C. limettoides</i> Tan.	0100802
25	Clementine	<i>C. clementina</i> hort. ex Tan.	0100092

<sup>a</sup> International *Citrus* variety numbering.

pathway.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant Materials and Juice Preparation.** Fruit of 25 genotypes belonging to the *Citrus* genus (Table 1) were harvested from adult trees at the last stage of fruit development [stage III (30)] during the 2004-2005 season. Fruit maturity depends on cultivar and climate. Fruit maturity was estimated using commercial maturity indicators (31, 32). Therefore, the development stage was characterized by determining juice content, soluble solids content (SSC), titratable acidity (TA), and maturity index (SSC/TA ratio) (Table 2).

Fruits were provided by the germplasm collection of the Station de Recherches Agronomiques INRA-CIRAD of San Giuliano. All trees were subjected to standard cultural practices. For each of the 25 varieties, 3 individual plants, growing in the same field, were used and 15 pieces of fruit were collected from each plant on the same day as in Dhuique-Mayer et al. (8). Thus, 3 samples of 15 fruits were separately analyzed for each variety.

Fruit samples were immediately hand-squeezed and filtered through a stainless steel sieve with 1 mm pore size. Juice content was expressed as percentage of fruit weight. Juices were placed in sealed amber vials (15 mL) under nitrogen and kept frozen at -20°C before analysis; storage time did not exceed 1 month. Maturity index determination was carried out on an aliquot of each fruit juice sample (15 mL). The TA of juices was determined by titration to pH 8.2 with 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH and expressed as percentage of anhydrous citric acid, and SSC was determined with a refractometer (Atago model, 0-32%). Maturity index was evaluated as the SSC/TA ratio.

**Table 2.** Characterization of Maturity Stage of the Genotypes Used

no.	common name	juice content (%±SD <sup>a</sup> )	SSC <sup>b</sup> ±SD	TA <sup>c</sup> (%±SD)	maturity index <sup>d</sup> ±SD
1	Willowleaf mandarin	35.0±3.2	9.9±0.7	1.0±0.1	10.0±1.6
2	Wase Satsuma	33.2±1.6	10.0±0.4	1.3±0.1	7.5±0.3
3	Hansen mandarin	46.9±2.4	9.4±0.6	1.5±0.1	6.2±0.9
4	Seedless pummelo	5.2±2.0	13.1±0.2	2.2±0.3	6.1±1.2
5	Deep Red pummelo	21.5±3.7	10.0±0.4	1.2±0.1	8.1±0.8
6	Chandler pummelo	19.4±0.9	11.5±0.5	1.1±0.1	10.6±0.3
7	Etrog citron			4.8±0.5	
8	Diamante citron			5.3±0.2	
9	Marsh grapefruit	31.6±1.4	10.8±0.2	1.6±0.0	6.6±0.2
10	Star Ruby grapefruit	31.9±0.1	10.2±1.1	1.7±0.2	6.0±0.0
11	Ray Ruby grapefruit	36.3±0.5	8.9±0.1	1.6±0.1	5.7±0.1
12	Shamouti orange	31.2±2.5	11.3±0.5	1.2±0.0	9.9±0.6
13	Sanguinelli orange	41.0±1.5	10.2±0.2	1.2±0.1	8.5±0.6
14	Cara Cara navel orange	44.3±3.3	10.1±0.1	0.9±0.0	10.8±0.7
15	Huang pi Chen orange	39.9±3.9	7.4±0.3	1.2±0.1	6.4±0.6
16	Maroc sour orange	24.1±3.5		4.1±0.3	
17	Bouquetier de Nice	18.6±2.3		3.3±0.2	
18	Myrtle-leaf orange	32.4±1.4		3.6±0.0	
19	Eureka Frost lemon	39.1±0.9		4.9±0.1	
20	Volkamer lemon	37.3±1.5		4.5±0.3	
21	Meyer lemon	41.1±2.3		4.1±0.1	
22	Rangpur lime	42.4±1.0		5.0±0.2	
23	Mexican lime	32.7±1.8		7.5±0.1	
24	Palestine sweet lime	33.5±2.0	7.4±0.3	0.0±0.0	
25	Clementine	32.6±2.2	10.8±0.3	0.7±0.0	16.3±1.7

<sup>a</sup> SD, standard deviation. <sup>b</sup> SSC, soluble solid content. <sup>c</sup> TA, titratable acidity expressed as percentage of anhydrous citric acid. <sup>d</sup> SSC/TA ratio.

**Table 3.** Spectral characteristics of carotenoids found in juices of 25 genotypes

no.	RT (min±SD <sup>a</sup> )	tentative identification	$\lambda_{\max}$ (nm) observed				$\lambda_{\max}$ (nm) literature				ref		
			peak I	peak II	peak III	% III/II	peak I	peak II	peak III	% III/II			
1	15.76±0.09	cis-apocarotenoid	cis328	408	430	458		405	430	460	10	33	
2	16.33±0.04	unidentified	cis328	416	439	468	76	418	441	470	81.6	9	
3	17.35±0.04	neochrome		399	422	448	75	399.7	420	446		10	
4	17.96±0.05	unidentified		400	422	448							
5	18.71±0.07	cis-violaxanthin	cis328	412	436	464	81	cis328	414	438	466	95.1	9
6	19.59±0.04	luteoxanthin		396	418	443	75		397	419	445	92.4	9
7	19.92±0.04	mutatoxanthin		404	426	448	31		406.5	427.5	451.5		36
8	20.57±0.09	lutein <sup>b</sup>		422	444	472	48		421	445	474	60	33
9	20.78±0.06	unidentified		407	428	451							
10	21.89±0.04	zeaxanthin <sup>b</sup>		426	450	476	17		428	450	478	26	33
11	22.55±0.04	cis-antheraxanthin	cis330	417	440	468	47		418.7	440.5	466.8		10
12	24.25±0.08	unidentified		422	446	473	44						
13	25.40±0.09	unidentified	cis338	420	444	470							
14	25.89	unidentified		406	428	452	40						
15	26.10±0.04	$\alpha$ -cryptoxanthin		422	445	473	47		421	445	475	60	33
16	26.96±0.06	zeinoxanthin		276	286	298			276	286	297	10	33
17	28.16±0.08	$\beta$ -cryptoxanthin <sup>b</sup>		427	450	477	20		428	450	478	27	33
18	28.59±0.03	phytofluene		331	348	368	68		331	348	367	90	33
19	32.25±0.09	$\zeta$ -carotene		379	400	424	90		379	400	424	85.9	9
20	33.35±0.09	$\alpha$ -carotene		422	444	470	34		422	445	473	55	33
21	35.51±0.09	$\beta$ -carotene <sup>b</sup>			452	477	12		425	450	477	25	33
22	36.84±0.09	cis- $\beta$ -carotene	cis342	425	449	475		cis340	422	446	473	34	19
23	38.82±0.04	unidentified		433	456	488							
24	45.95	lycopene cis-isomer	cis355	441	466	490		cis358	438	465	493	45	9
25	55.57±0.06	lycopene <sup>b</sup>		446	472	502	71		448	474	506	73.7	9

<sup>a</sup> RT, retention time ± SD, standard deviation. <sup>b</sup> identified using authentic standards. Solvents used were water, MeOH and MTBE (refs 19, 10, and 36), water, MeCN:MeOH (75:25), and MTBE (ref 9) and petroleum ether or EtOH or hexane (ref 33). Whatever the solvent, gradient programs were different. As a result these data were only used to compare spectral characteristics found with those already described in different solvents.

**Reagents and Standards.** Extraction solvents were RPE grade hexane, ethanol, and dichloromethane from Carlo-Erba (Val de Reuil, France). Analytic solvents were HPLC grade methanol from Carlo-Erba and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Reagents for analyses were pure grade sodium chloride, sodium sulfate, magnesium hydroxide carbonate, and 0.1 N sodium hydroxide from Carlo-Erba. Standards used were purchased from Extrasynthese (Genay, France):  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, zeaxanthin, lutein, lycopene,  $\beta$ -apo-8'-carotenal (purity of

standards was verified by HPLC and photodiode array detection).

**Preparation of Standards.** Concentrations of standard solutions were calculated by spectrophotometric measurement dissolving standard with the appropriate solvent and using a molar extinction coefficient ( $\epsilon$ mol) (33). To prepare the solution of internal standard, lycopene or  $\beta$ -apo-8'-carotenal was diluted in dichloromethane to obtain a final concentration of 120 mg L<sup>-1</sup> for lycopene and 260 mg L<sup>-1</sup> for  $\beta$ -apo-8'-carotenal.

**Table 4.** Carotenoid Contents (Miligrams per Liter) in Juices of 25 Genotypes

carotenoids RT <sup>a</sup>		retention times												
		15.76	16.33	17.35	17.96	18.71	19.59	19.92	20.57	20.78	21.89	22.55	24.25	25.4
Willowleaf mandarin	mean	0.331	0.770	0.417	- <sup>b</sup>	2.389	-	-	0.670	-	0.682	0.942	0.586	0.338
	SD <sup>c</sup>	0.045	0.080	0.075	-	0.249	-	-	0.067	-	0.060	0.069	0.071	0.072
Wase Satsuma	mean	0.280	1.571	0.443	-	4.327	-	-	0.953	-	0.586	0.981	2.220	0.390
	SD	0.031	0.072	0.042	-	0.314	-	-	0.055	-	0.039	0.167	0.199	0.068
Hansen mandarin	mean	0.558	1.555	0.590	-	7.604	0.487	-	1.266	-	1.194	2.197	0.957	0.327
	SD	0.041	0.245	0.042	-	0.924	0.027	-	0.089	-	0.152	0.208	0.118	0.045
Seedless pummelo	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deep Red pummelo	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chandler pummelo	mean	-	0.099	0.074	-	0.819	-	-	0.086	-	-	0.150	-	-
	SD	-	0.007	0.017	-	0.009	-	-	0.002	-	-	0.008	-	-
Etrog citron	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diamante citron	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marsh grapefruit	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Star Ruby grapefruit	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ray Ruby grapefruit	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shamouti orange	mean	0.663	2.904	1.411	0.485	10.581	0.463	0.409	1.155	-	0.853	2.594	0.176	-
	SD	0.046	0.155	0.212	0.035	1.038	0.043	0.055	0.072	-	0.065	0.437	0.036	-
Sanguinelli orange	mean	0.355	2.097	1.547	0.499	13.372	0.591	0.731	2.534	-	1.577	4.402	-	-
	SD	0.070	0.076	0.344	0.072	0.388	0.029	0.185	0.332	-	0.066	0.589	-	-
Cara Cara navel orange	mean	0.365	1.250	0.901	0.226	5.469	0.249	0.383	1.138	-	0.550	1.691	0.074	-
	SD	0.098	0.203	0.115	0.023	0.647	0.020	0.079	0.203	-	0.134	0.239	0.015	-
Huang pi Chen orange	mean	-	0.222	0.126	-	0.315	0.099	-	0.190	-	tr	tr	-	-
	SD	-	0.026	0.019	-	0.053	0.019	-	0.049	-	-	-	-	-
Maroc sour orange	mean	-	-	-	-	0.079	-	0.099	0.131	-	0.050	tr	0.075	0.062
	SD	-	-	-	-	0.023	-	0.018	0.034	-	0.011	-	0.013	0.013
Bouquetier de Nice	mean	-	-	-	-	0.400	0.082	-	-	0.132	0.092	0.255	0.129	0.104
	SD	-	-	-	-	0.050	0.008	-	-	0.027	0.014	0.043	0.037	0.046
Myrtle-Leaf orange	mean	-	-	-	-	0.462	0.131	0.157	0.186	-	0.119	0.297	0.180	0.186
	SD	-	-	-	-	0.082	0.034	0.034	0.016	-	0.024	0.052	0.012	0.030
Eureka Frost lemon	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Volkamer lemon	mean	0.291	0.219	0.218	-	0.990	0.349	0.191	-	0.267	0.123	0.416	-	0.161
	SD	0.004	0.008	0.012	-	0.055	0.033	0.020	-	0.024	0.012	0.085	-	0.006
Meyer lemon	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rangpur lime	mean	-	0.698	0.248	-	0.618	-	0.180	0.306	-	0.293	-	0.606	0.155
	SD	-	0.021	0.038	-	0.090	-	0.047	0.049	-	0.055	-	0.118	0.048
Mexican lime	mean	-	-	-	-	-	-	-	0.057	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	0.008	-	-	-	-	-
Palestine sweet lime	mean	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clementine	mean	0.351	1.247	0.614	-	3.261	0.256	0.230	0.733	-	0.830	1.160	0.761	0.329
	SD	0.039	0.163	0.073	-	0.321	0.036	0.016	0.080	-	0.050	0.088	0.113	0.046
<i>F</i> value		127.1	304.9	56.6	202.6	257.7	347.9	46.3	141.5	194.1	223.0	99.0	161.2	78.8
<i>P</i> > <i>F</i> (%)		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
LSD <sup>e</sup>		0.052	0.131	0.168	0.028	0.64	0.028	0.075	0.148	0.012	0.084	0.31	0.113	0.044

carotenoids <sup>a</sup>		retention times												
		25.89	26.1	26.96	28.16	28.59	32.25	33.35	35.51	36.84	38.82	45.95	55.57	total
Willowleaf mandarin	mean	- <sup>b</sup>	0.298	1.126	10.287	1.267	0.465	0.133	1.781	-	-	-	-	22.481
	SD <sup>c</sup>	-	0.043	0.262	0.698	0.258	0.047	0.051	0.373	-	-	-	-	1.620
Wase Satsuma	mean	-	0.642	0.504	17.507	1.737	0.991	0.082	0.427	-	-	-	-	33.642
	SD	-	0.044	0.052	0.897	0.166	0.044	0.026	0.030	-	-	-	-	1.919
Hansen mandarin	mean	-	0.543	3.004	11.661	3.633	2.487	0.099	1.230	-	-	-	-	39.392
	SD	-	0.053	0.547	1.714	0.552	0.365	0.009	0.228	-	-	-	-	5.317
Seedless pummelo	mean	-	-	0.138	-	0.081	0.065	-	0.329	-	-	-	0.300	0.912
	SD	-	-	0.009	-	0.007	0.007	-	0.100	-	-	-	0.102	0.189
Deep Red pummelo	mean	-	-	0.138	-	0.079	-	-	0.943	-	-	-	1.536	2.697
	SD	-	-	0.025	-	0.014	-	-	0.115	-	-	-	0.076	0.096
Chandler pummelo	mean	-	-	0.083	-	-	-	-	0.360	-	-	-	0.495	2.165
	SD	-	-	0.020	-	-	-	-	0.105	-	-	-	0.122	0.024
Etrog citron	mean	tr <sup>d</sup>	-	-	0.093	-	-	-	0.134	-	-	-	-	0.227
	SD	-	-	-	0.022	-	-	-	0.007	-	-	-	-	0.019
Diamante citron	mean	-	-	-	0.057	-	-	-	0.122	-	-	-	-	0.179
	SD	-	-	-	0.012	-	-	-	0.016	-	-	-	-	0.026
Marsh grapefruit	mean	-	-	tr	-	tr	tr	-	tr	-	-	-	-	tr
	SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 4. (Continued)

		retention times												
carotenoids <sup>a</sup>		25.89	26.1	26.96	28.16	28.59	32.25	33.35	35.51	36.84	38.82	45.95	55.57	total
Star Ruby grapefruit	mean	-	-	2.130	-	1.711	0.369	-	2.826	0.171	0.287	-	10.072	17.566
	SD	-	-	0.098	-	0.068	0.020	-	0.105	0.022	0.045	-	0.652	0.775
Ray Ruby grapefruit	mean	-	-	0.581	-	0.510	0.293	-	1.142	-	-	-	6.855	9.381
	SD	-	-	0.143	-	0.132	0.061	-	0.362	-	-	-	2.758	3.444
Shamouti orange	mean	-	0.288	0.758	2.694	0.703	0.957	0.091	0.587	-	-	-	-	27.770
	SD	-	0.036	0.082	0.362	0.084	0.125	0.024	0.053	-	-	-	-	2.064
Sanguinelli orange	mean	-	1.026	1.123	3.979	1.107	1.241	0.232	0.289	-	-	-	-	36.703
	SD	-	0.111	0.111	0.230	0.100	0.071	0.029	0.020	-	-	-	-	0.573
Cara Cara navel orange	mean	-	0.182	13.059	1.698	5.062	1.213	0.122	1.521	-	0.073	0.254	2.263	37.743
	SD	-	0.030	1.107	0.327	0.298	0.077	0.013	0.106	-	0.027	0.073	0.501	1.385
Huang pi Chen orange	mean	-	-	0.265	tr	0.191	0.255	-	0.079	-	-	-	-	1.743
	SD	-	-	0.088	-	0.053	0.066	-	0.008	-	-	-	-	0.094
Maroc sour orange	mean	-	-	-	1.415	-	0.149	-	0.203	-	-	-	-	2.263
	SD	-	-	-	0.153	-	0.018	-	0.050	-	-	-	-	0.210
Bouquetier de Nice	mean	-	-	-	2.044	-	0.151	-	0.058	-	-	-	-	3.446
	SD	-	-	-	0.266	-	0.041	-	0.008	-	-	-	-	0.497
Myrtle-Leaf orange	mean	-	-	-	3.312	-	0.192	-	-	-	-	-	-	5.224
	SD	-	-	-	0.642	-	0.030	-	-	-	-	-	-	0.918
Eureka Frost lemon	mean	tr	-	-	0.165	tr	0.126	-	tr	-	-	-	-	0.291
	SD	-	-	-	0.007	-	0.026	-	-	-	-	-	-	0.020
Volkamer lemon	mean	-	-	0.151	2.510	0.285	0.241	-	0.105	-	-	-	-	6.517
	SD	-	-	0.010	0.098	0.024	0.028	-	0.016	-	-	-	-	0.181
Meyer lemon	mean	-	-	0.097	0.863	-	0.108	-	0.192	-	-	-	-	1.260
	SD	-	-	0.016	0.046	-	0.012	-	0.032	-	-	-	-	0.067
Rangpur lime	mean	-	-	-	3.996	0.187	0.253	-	0.862	-	-	-	-	8.403
	SD	-	-	-	0.119	0.024	0.021	-	0.237	-	-	-	-	0.157
Mexican lime	mean	-	-	-	-	-	-	0.053	0.239	-	-	-	-	0.349
	SD	-	-	-	-	-	-	0.008	0.031	-	-	-	-	0.046
Palestine sweet lime	mean	-	-	-	0.280	-	-	-	tr	-	-	-	-	0.280
	SD	-	-	-	0.009	-	-	-	-	-	-	-	-	0.007
Clementine	mean	-	0.214	0.946	9.087	1.265	1.098	0.147	2.434	-	-	-	-	24.962
	SD	-	0.041	0.081	0.545	0.069	0.059	0.060	0.201	-	-	-	-	1.169
<i>F</i> value		200.8	247.0	316.5	62.2	212.1	155.5	39.1	86.9	1193.9	67.9	46.9	51.8	
<i>P</i> > <i>F</i> (%)		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
LSD <sup>e</sup>		0.002	0.047	0.426	0.806	0.246	0.135	0.029	0.240	0.003	0.019	0.020	0.954	

<sup>a</sup> carotenoids are designed by their retention time in order of elution. <sup>b</sup> not detected. <sup>c</sup> SD, standard deviation. <sup>d</sup> tr<0.05 mg L<sup>-1</sup>. <sup>e</sup> least significant difference. For  $\beta$ -cryptoxanthin the limit of detection (LOD) is 0.0046  $\mu$ g and the limit of quantification (LOQ) 0.0152  $\mu$ g. Concentrations are the mean of at least three independent determinations. The 25 genotypes are significantly different for all the 25 carotenoid pigments ( $P < 0.01\%$ )

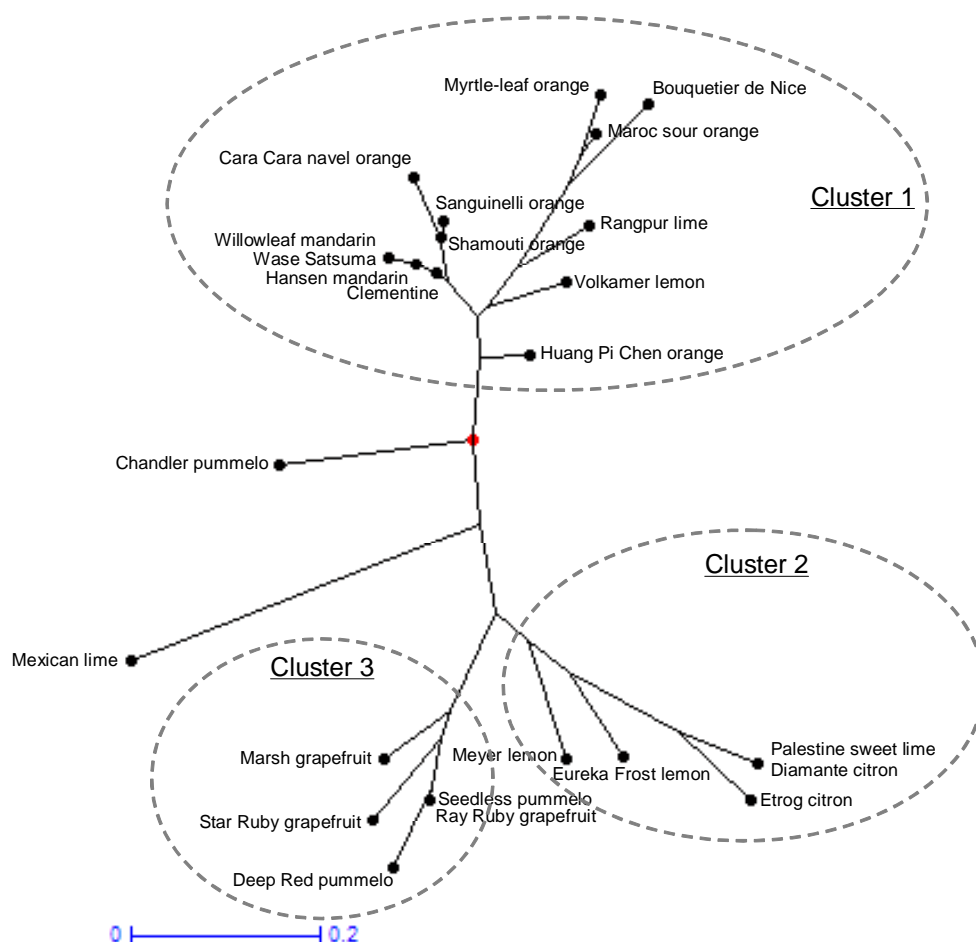
**Carotenoid Extraction.** Carotenoid extraction was carried out according to the method of Dhuique-Mayer et al. (8). Twenty grams of juice was stirred with 120 mg of MgCO<sub>3</sub> and 35 mL of extraction solvent (ethanol/hexane, 4:3 v/v, containing 0.1% of BHT as antioxidant) for 5 min. Lycopene (750  $\mu$ L of solution, equivalent to 90  $\mu$ g) or  $\beta$ -apo-8'-carotenal (150  $\mu$ L, equivalent to 40  $\mu$ g) was added as an internal standard. Residue was separated from the liquid phase by filtration with a filter funnel (porosity no. 2) and re-extracted with 35 mL of ethanol/hexane (4:3, v/v). The residue was washed with 30 mL of ethanol and with 30 mL of hexane until it was colorless. Organic phases were transferred in a separatory funnel and successively washed with 2  $\times$  50 mL of 10% sodium chloride and 3  $\times$  50 mL of distilled water. The aqueous layer was removed. The hexanic phase was dried using anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated at 40°C in a rotary evaporator. The residue was dissolved in 500  $\mu$ L of dichloromethane and 500  $\mu$ L of MTBE/methanol (80:20, v/v). This solution was diluted 6-fold in a MTBE/methanol mixture for varieties with numbers 1, 2, 3, 10-14, and 25 (see Table 1) and 3-fold for varieties with numbers 16-18 and 20-22. Samples were placed in amber vials before HPLC analysis.

**Saponification.** Hexanic extract was evaporated with a rotary evaporator, redissolved with 20 mL of hexane, and placed in a 50 mL amber vial to which was added 20 mL of 10% methanolic KOH. Saponification was performed overnight at room temperature protected from the light. The sample was shaken under nitrogen in the sealed vial. The sample was transferred to a separatory funnel to which 50 mL of distilled water was added to separate the layers. The hexanic layer was washed with

distilled water until free of alkali. The methanolic KOH layer was extracted with 3  $\times$  10 mL of dichloromethane. The extracts were pooled and washed to remove alkali. The extracts were dried using anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated in a rotary evaporator. The residue was dissolved as described above. Analyses were carried out under red light to avoid carotenoid degradation during extraction and saponification.

**HPLC Analysis of Carotenoids.** Carotenoids were analyzed by HPLC using an Agilent 1100 system (Massy, France) according to the previously published method of Dhuique-Mayer et al. (8). Carotenoids were separated along a C<sub>30</sub> column [250  $\times$  4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m YMC (EUROP GmbH)]; the mobile phases were H<sub>2</sub>O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL min<sup>-1</sup>, column temperature was set at 25°C, and injection volume was 20  $\mu$ L. A gradient program was performed: the initial condition was 40% A/60% B; 0-5 min, 20% A/80% B; 5-10 min, 4% A/81% B/15% C; 10-60 min, 4% A/11% B/85% C; 60-71 min, 100% B; 71-72 min, back to the initial condition for reequilibration. Absorbance was followed at 290, 350, 400, 450, and 470 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV-visible spectra were collected, stored, and integrated using an Agilent Chemstation plus software.

**Identification and Quantification of Carotenoids.** Carotenoids were identified using retention times, absorption spectra, and coinjection with authentic standards. The spectral fine structure value, % III/II, was calculated as the percentage of the quotient between band III and band II ( $\lambda_{max}$ ), taking the trough between the two bands as the baseline. The UV-visible



**Figure 1.** Diversity of carotenoid profiles of the 25 genotypes on the basis of the presence or absence of carotenoids. The tree was constructed according to the neighbour-joining method using a dice matrix of dissimilarity. The three clusters that we have identified are circled.

spectra and % III/II were compared with those reported in the literature. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein, lycopene, and  $\beta$ -apo-8'-carotenal with five concentrations. Correlation coefficients ranged from 0.994 to 0.998. Other carotenoids were quantified as  $\beta$ -carotene. Each carotenoid was quantified using area collected at 290, 350, 400, 450, or 470 nm depending on its maximum  $\lambda$ . Recoveries were determined by adding internal standard (lycopene or  $\beta$ -apo-8'-carotenal) before the extraction of each sample analyzed and used to correct carotenoid contents after HPLC analysis. The concentration of each carotenoid was expressed as milligrams per liter. Analysis precision was checked from three consecutive extractions-saponifications-injections of one sample (corresponding to one plant), and coefficients of variation were  $\leq 5\%$ . Coefficients of variation obtained from three consecutive extractions-saponifications-injections of three samples belonging to the same variety (corresponding to three plants) were  $\leq 20\%$  for almost all carotenoids and  $\leq 30\%$  for  $\beta$ -carotene and lycopene of grapefruit and pummelo varieties. Concentrations are given as the mean of data from three extractions. The total contents in carotenoid pigments of juices from the 25 genotypes were calculated by summing concentrations of all compounds. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated for  $\beta$ -cryptoxanthin by preparing serial dilutions of this compound in mobile phase (concentrations ranging from 1 to 10 mg L<sup>-1</sup>). Calibration curves and then LOD and LOQ were determined

with  $LOD > 3 \times S/a$  and  $LOQ > 10 \times S/a$  (where  $S$  is the standard deviation of the blank signal and  $a$  the slope of the calibration curve).

**Statistical Analyses.** The data matrix was composed of the contents (mean of three samples) of 25 carotenoid variables and 25 genotypes. The carotenoid variables were scored as 1 for the presence and 0 for the absence for qualitative analysis. @DARwin 4.0 software (CIRAD, Montpellier, France) was used for dissimilarity analysis and tree construction. Two representations were constructed according to the neighbor-joining method and from the presence or absence of variables and a matrix of Dice's distances for the first one and from carotenoid contents and Euclidian distances for the second one. Connections between clusters and qualitative variables were analyzed according to the chi2 method using the MEANS and FREQ procedures of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989). The statistical comparison of data was performed by ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., 1989) to reveal significant differences among the 25 genotypes studied.

## RESULTS

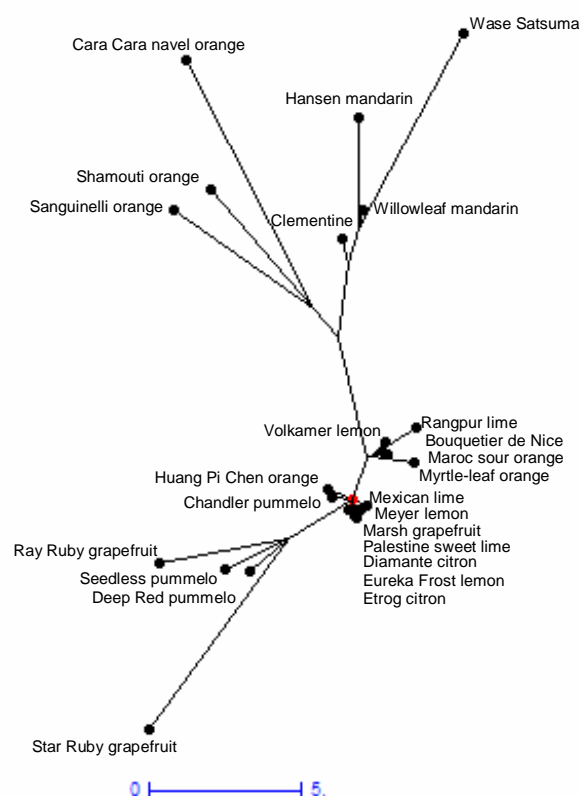
**Diversity of Carotenoid Composition of *Citrus* Genotypes.** For each of the 25 varieties at least 3 juice samples (three plants) were analyzed by HPLC. Twenty-five carotenoids were detected, and their chromatographic and spectral characteristics are reported in Table 3. Variations in retention time were  $\leq 6\%$ ,



and variations in wavelength were  $\leq 7\%$  for all pigments. Five carotenoids were identified by comparison of their retention time and UV-visible spectra with those of standards. Others pigments were tentatively identified using spectral characteristics reported in the literature. Spectral characteristics of peaks match those reported with an average difference of  $\leq 5\%$ . Carotenoid contents were determined and expressed as the average concentration of three data in milligrams per liter (Table 4). The comparison of data by ANOVA showed that the 25 genotypes were significantly different for all carotenoid pigments ( $P < 0.01\%$ ). Consequently, a very strong effect of genotype is found to explain the variability of each component. Mandarins, oranges (apart from Huang pi Chen orange), and Clementines were the species richest in carotenoid contents (total contents  $\geq 22.481$  mg L<sup>-1</sup>). Star Ruby and Ray Ruby grapefruits were also among the richest citrus varieties with high total carotenoid contents of 17.566 and 9.381 mg L<sup>-1</sup>, respectively, whereas Marsh grapefruit presented only traces of phytoene, phytofluene,  $\zeta$ -carotene, and  $\beta$ -carotene. Sour oranges and pummelos presented total contents between those of mandarins, oranges, and Clementines and those of lemons, limes, and citrons, which were the poorest in pigments (total contents  $\leq 1.26$  mg L<sup>-1</sup>). However, Volkamer lemon and Rangpur lime were richer in pigments than sour oranges or pummelos, with 6.517 and 8.403 mg L<sup>-1</sup>, respectively, as total contents.  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -carotene, *cis*-violaxanthin, and lycopene appeared to widely contribute to the total amount of carotenoids, although some of them were absent in fruits of several genotypes. Thus, differences between the 25 genotypes were qualitative and quantitative. Moreover, the analyses revealed more interspecific differences than intraspecific differences.

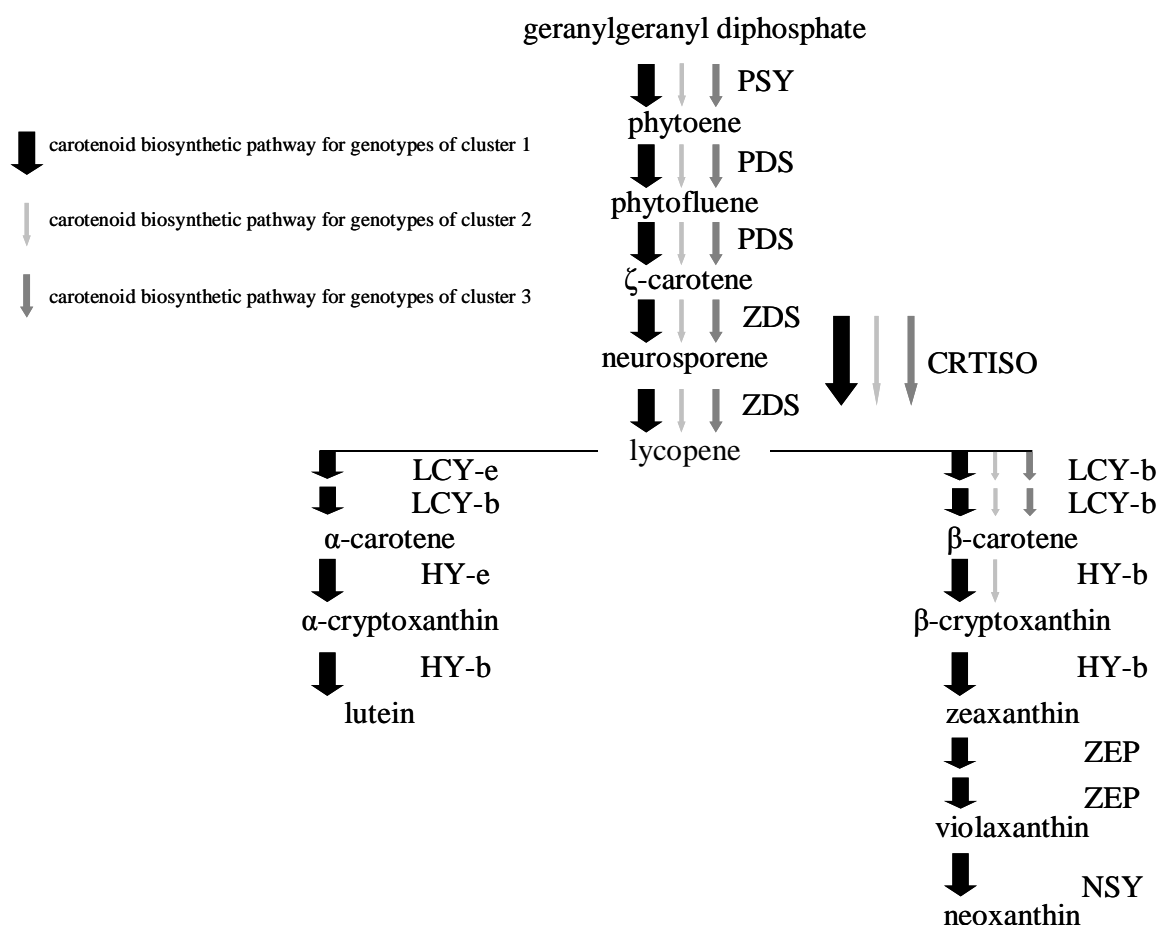
**Organization of the Carotenoid Diversity Based on the Presence/Absence of Each Compound.** The tree of Figure 1 was constructed on the basis of the presence or absence of each carotenoid. The 25 genotypes were classified in 3 clusters. The first one comprised 13 genotypes (3 mandarins, Clementine, 4 oranges, 3 sour oranges, Rangpur lime, and Volkamer lemon). The second cluster was smaller, with 5 genotypes (2 citrons, 2 lemons, and Palestine sweet lime). The third one also contained 5 genotypes (2 pummelos and 3 grapefruits). Mexican lime and Chandler pummelo were not included in these three clusters. Clusters and carotenoid variables were analyzed according to the chi2 method to determine which pigments were mainly responsible for these clusters. Two carotenoids strongly determined this classification: *cis*-violaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin. *cis*-Violaxanthin was present in all varieties belonging to cluster 1, whereas this pigment was absent in the varieties of cluster 2. Similarly,  $\beta$ -cryptoxanthin was present in all varieties belonging to clusters 1 and 2 but was absent for varieties of cluster 3. Moreover, other xanthophylls were also important for cluster 1: lutein, isolutein, and zeaxanthin. Conversely, some carotenoids did not contribute to the cluster formation such as peaks 4, 9, 14, and 21-24 (see Table 3). These pigments were present in only one or two varieties apart from  $\beta$ -carotene (peak 21), which was present in almost all of them. Thus, for qualitative data it was possible to distribute the 23 citrus genotypes in 3 main clusters. Varieties belonging to the same species were included in the same cluster except for Rangpur lime and Volkamer lemon, which were located in cluster 1 and not in cluster 2 as expected.

**Organization of the Carotenoid Diversity Based on the Concentration of Each Compound.** The tree of Figure 2 was obtained on the basis of the average concentration of each



**Figure 2.** Diversity of carotenoid profiles of the 25 genotypes on the basis of carotenoid contents. The tree was constructed according to the neighbor-joining method using Euclidian distances.

carotenoid from juices of three samples. To evaluate the quantitative data impact on the classification previously obtained (Figure 1), we have imposed the structure of the tree of Figure 1 for the construction of the one of Figure 2. It is important to note that the distance scales are not the same in Figures 1 and 2. Quantitative data revealed more information at the intraspecific level. Concerning the varieties that were included in cluster 1 of Figure 1, mandarins and Clementines were separated from oranges in Figure 2. Mandarins and Clementines accumulated high amounts of  $\beta$ -cryptoxanthin, whereas oranges accumulated high quantities of *cis*-violaxanthin (the  $\beta$ -cryptoxanthin/*cis*-violaxanthin ratio was  $\geq 1.5$  for mandarin and Clementine varieties and  $\leq 0.3$  for orange varieties) (see Table 4). Sour oranges, Rangpur lime, and Volkamer lemon were no longer in cluster 1. Huang pi Chen orange was closer to cluster 2, this genotype having a low carotenoid content in juice.  $\beta$ -Cryptoxanthin was the major pigment in sour oranges, Rangpur lime, and Volkamer lemon. *cis*-Violaxanthin was the major pigment in Huang pi Chen orange, but the contents of these pigments were roughly 3 times lower than for oranges, mandarins, and Clementines. It is worth noting that the repartition of the mandarin varieties in Figures 1 and 2 does not overlap. This was due to differences in  $\beta$ -cryptoxanthin contents. Similarly, the spread of the group of oranges could be explained by contents in *cis*-violaxanthin. Cara Cara orange was far away from the other oranges; the accumulation of carotene such as phytoene, phytofluene, and lycopene was higher. Concerning cluster 2, all genotypes accumulated low amounts of carotenoids, which explained why all varieties overlapped. In cluster 3, the spread of the group of pummelos and grapefruits was also greater. Two genotypes were distant: Marsh grapefruit contained



**Figure 3.** Carotenoid biosynthetic pathway obtained through the qualitative carotenoid composition in 25 citrus genotypes. Behaviors of genotypes of each cluster are represented by different arrows. PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; ZDS, ζ-carotene desaturase; CRTISO, carotenoid isomerase; LCY-b, lycopene β-cyclase; LCY-e, lycopene ε-carotene hydroxylase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NSY, neoxanthin synthase.

only traces of pigments, which explained why it overlapped varieties of cluster 2, and Star Ruby grapefruit presented the highest content of lycopene.

## DISCUSSION

### Genotypic Component of Carotenoid Content Diversity.

We analyzed the carotenoid composition of the 25 genotypes to evaluate the contribution of genotype diversity to carotenoid profiles. Because the samplings were quite high (45 fruits per genotype) and several extraction/saponification/HPLC analyses were performed for each genotype, we can conclude that the contribution of the genotype diversity to the variance of each carotenoid is very high. Therefore, the carotenoid diversity is highly influenced by genetic factors when other sources of variation such as growing conditions, geographical origin, fruit maturity, and method of analysis are minimized. Then, we can analyze more accurately the relationships between genetic and carotenoid diversities.

**Relationships between the Organization of Carotenoid Contents and Genetic Diversity.** Twenty-five genotypes were evaluated on the basis of the carotenoids detected in juices. The

classification obtained allowed us to distribute the genotypes in three clusters. Cluster 1 of **Figure 1** contained the three mandarins (*C. reticulata*), cluster 2 the two citrons (*C. medica*), and cluster 3 two of the three pummelos (*C. maxima*). These three species being the three basic taxa of cultivated *Citrus*, our results suggest that, as for other phenotypal traits, the general evolution of cultivated *Citrus* has been the main factor of the organization of carotenoid diversity. Looking to secondary species, the classification obtained from qualitative data (presence-absence of 25 carotenoid components; **Figure 1**) is in agreement with previous classifications based on molecular markers, leading to phylogenetic inferences. In fact, in cluster 1, sweet oranges and sour oranges were close to mandarins. It was demonstrated that they were closely related with mandarins but possessed some alleles of pummelos (26). Clementine was also in cluster 1 and, according to previous studies, this genotype was found to be a hybrid between a mandarin and a sweet orange (27). Rangpur lime and Volkamer lemon, which belong to cluster 1, are hybrids between citron and mandarin and between citron and sour orange, probably back-crossed with mandarin, respectively (27). The two *C. limon* and the lime varieties were in cluster 2 close to the citron, as was found with molecular

markers. Nicolosi et al. (27) suggested that lemons were hybrids between citron and sour orange and that Palestine sweet lime was a hybrid between a citron and a sweet orange. Similarly, grapefruits were present in cluster 3. Indeed, they were found to be hybrids between pummelo and sweet orange (27). Moreover, Mexican lime and Chandler pummelo, which should be expected to be included in clusters 2 and 3, respectively, were isolated. Concerning Mexican lime, one possible explanation is that Mexican lime is a hybrid between a citron and *Citrus micrantha* (27), a species that was not included in our study. The *C. micrantha* parent may be responsible of the position of Mexican lime on the tree of **Figure 1**. To confirm our conclusion, the same method of analysis should be applied to other genotypes.

**Relationships between Carotenoid Profiles and Steps of the Biosynthetic Pathway.** One purpose was to try to identify the steps of the carotenoid biosynthetic pathway involved in differential carotenoid accumulation. The behavior of genotypes of each cluster is illustrated in **Figure 3**, where each arrow shows which pigments were synthesized. Genotypes of cluster 1 produced the *cis*-violaxanthin and the lutein or the isolutein. It is important to stress that isolutein comes from lutein by oxidation that occurs in fruit (33). For genotypes of cluster 2, the last detected compound was  $\beta$ -cryptoxanthin. Concerning genotypes of cluster 3, the last detected compound was  $\beta$ -carotene. For cluster 1, our results lead us to guess that the transformation of  $\beta$ -carotene into  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin by hydroxylations catalyzed by  $\beta$ -carotene hydroxylase (HY-b) are key steps. The transformation of zeaxanthin into violaxanthin by zeaxanthin epoxidase (ZEP) seems also to play a major role. Indeed, the  $\beta$ -cryptoxanthin/*cis*-violaxanthin ratio allows the orange group to be differentiated from the mandarin group (tree of **Figure 2**). Concerning the five genotypes of cluster 2, qualitative data and especially quantitative data suggest that the most important step is the formation of phytoene from geranylgeranyl diphosphate by the action of a phytoene synthase (PSY). Actually, for all of the genotypes of cluster 2, carotenoid contents were very low. From the qualitative data, the last compound detected for the genotypes of cluster 3 was  $\beta$ -carotene. However, from the quantitative point of view, lycopene was present in a very large amount, which suggests the importance of the cyclization of lycopene, which is a branching point in the pathway.

**Relationships between Biosynthetic Pathway Functionality and *Citrus* Evolutionary Process.** Our results provide some evidence that at the interspecific level differences are qualitative and that it can be due to the allopatric evolution of the three taxa and a limitation of sexual recombination. Actually, genotypes of cluster 1, closely related with mandarins, synthesized all compounds and particularly *cis*-violaxanthin. For genotypes of cluster 2, related with citrons, and for genotypes of cluster 3, related with pummelos, the biosynthesis was stopped at the level of  $\beta$ -cryptoxanthin and  $\beta$ -carotene, respectively. Lutein was not detected for genotypes of clusters 2 and 3. At the intraspecific level, differences are quantitative. It can be illustrated by differences reported for *C. sinensis* varieties. On the basis of qualitative data these genotypes were placed in cluster 1, whereas quantitative data showed strong differences. These results can be explained by mutational events that are responsible for the diversification among these genotypes.

**Hypothesis on the Regulation Mechanisms at These Key Steps.** Several possible mechanisms were considered to explain the regulation of the carotenoid biosynthetic pathway. One possible explanation was the existence of several isoforms of

enzyme encoded by different genes or the existence of several alleles of one gene. A second explanation was a differential expression of the biosynthetic genes at the transcriptional level. Another one was a defect in one enzyme activity or in an enzyme-associated factor. Studies on tomato have demonstrated that the accumulation of lycopene during fruit ripening was controlled by transcriptional regulation with an increase of the expression of PSY and PDS genes and a down-regulation of LCY-b and LCY-e (34). In *Citrus*, Rodrigo et al. (19) and Kato et al. (11) also demonstrated that during fruit development differential gene expression at the transcriptional level explained differences in carotenoid accumulation. To our knowledge, only Kato et al. (11) studied the expression of the biosynthetic genes using several genotypes belonging to different species. These authors showed that the mechanism leading to diversity in  $\beta$ , $\beta$ -xanthophyll composition between Satsuma mandarin and Valencia orange was due to HY-b substrate specificity and the balance expression between upstream biosynthetic genes (PSY, PDS, ZDS, and LCY-b) and downstream biosynthetic genes (HY-b and ZEP). Regulation of gene expression at the transcriptional level seems to be the major mechanism controlling the carotenoid accumulation during fruit ripening and controlling the differences in carotenoid accumulation between varieties. However, other mechanisms should be investigated to explain the differences between genotypes at mature stage. Actually, regulation at the transcriptional level appears to be more relevant to explain differences between genotypes that are close in phylogenetic classifications. This proposition is supported by the study of Kato et al. (11), who have shown that the differences between mandarin and orange were explained by this regulation. The presence of different isoforms or different alleles of the biosynthetic genes should be studied using genotypes belonging to the different clusters previously formed. For example, the existence of several isoforms of HY-b was supported by studies on tomato and pepper, where two isoforms were present depending on the tissue concerned (35). In *Citrus*, Kim et al. (21) isolated two clones, CHX1 and CHX2, encoding for HY-b that corresponded to alleles of the same gene. In addition, their results suggested that the expression of HY-b gene was not regulated at the transcriptional level during mandarin fruit ripening and that another isoform of HY-b or other enzymes involved in the carotenoid biosynthesis may be transcriptionally regulated. Whatever the regulation mechanisms, extended experiments are required. Indeed, it would be necessary to monitor the gene expression of varieties of the same cluster to verify that carotenoid contents are dependent on the gene expression involved in the key steps. It would also be interesting to check if qualitative differences among clusters are related to the allelic diversity. For that, the estimation of the number of gene loci and their sequencing would be required.

**Conclusion.** Our results based on the presence or absence of carotenoid compounds showed that the 25 genotypes were included in only 3 clusters. This classification is in agreement with previous genetic studies. It stresses the fact that at the interspecific level, the organization of the diversity of carotenoid composition is linked to the global evolution process of cultivated citrus rather than to more recent mutational/human selection process. However, this selection process has been clearly efficient for the intraspecific diversification of secondary species such as *C. sinensis* and *C. paradisi*. It mainly results in quantitative variations that should be related to the modification of specific enzymatic activities (mutation of the gene of the enzymes of the biosynthetic pathway) or to the modification of

gene regulation. The genotypes of each cluster may have specific functional or regulation mechanisms with respect to carotenoid biosynthesis. The different behaviors among the three clusters lead us to identify the most important steps of the biosynthetic pathway involved in the diversification of carotenoid contents in *Citrus* species. This information will be very useful for further genomic works on the variability of the origin of carotenoid biosynthesis.

# ACKNOWLEDGMENT

We thank C. Dubois (CIRAD, Montpellier, France) for helpful discussions and C. Jacquemond and F. Curk (SRA INRA-CIRAD, San Giuliano, France) for assistance.

# LITERATURE CITED

- (1) Yano, M. Cancer prevention by Citrus. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Chem.* **1999**, *47*, 128-135.
- (2) Garner, P. T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* **2000**, *68*, 471-474.
- (3) Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 430-439.
- (4) Riso, P.; Visioli, F.; Gardana, C.; Grande, S.; Brusamolino, A.; Galvano, F.; Galvano, G.; Porrini, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 941-947.
- (5) Gross, J. *Pigments in Fruits*; Harcourt Brace Javanovich: London, U.K., 1987. (6) Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Lapierre, L.; Corsetti, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4038-4045.
- (7) Lee, H. S.; Castle, W. S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 877-882.
- (8) Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M.-J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2140-2145.
- (9) Lee, H. S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2563-2568.
- (10) Goodner, K. L.; Rouseff, R. L.; Hofsmommer, H. J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1146-1150.
- (11) Kato, M.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Sugiura, M.; Hyodo, H.; Yano, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1-14.
- (12) Lee, H. S.; Coates, G. A. Characterization of color fade during frozen storage of red grapefruit juice concentrates. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3988-3991.
- (13) Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 210-218.
- (14) Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *385*, 4-12.
- (15) Isaacson, T.; Ronen, G.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* **2002**, *14*, 333-342.
- (16) Park, H.; Kreunen, S. S.; Cuttriss, A. J.; DellaPenna, D.; Pogson, B. J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, promellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell* **2002**, *14*, 321-332.
- (17) Cunningham, F. X.; Pogson, B.; Sun, Z.; McDonald, K. A.; DellaPenna, D.; Gantt, E. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$ -lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **1996**, *8*, 1613-1626.
- (18) Ikoma, Y.; Komatsu, A.; Kita, M.; Ogawa, K.; Omura, M.; Yano, M.; Moriguchi, T. Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* **2001**, *111*, 232-238.
- (19) Rodrigo, M.-J.; Marcos, J. F.; Zacarias, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6724-6731.
- (20) Rodrigo, M.-J.; Marcos, J. F.; Alferez, F.; Mallent, M. D.; Zacarias, L. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J. Exp. Bot.* **2003**, *54*, 727-738.
- (21) Kim, I.-J.; Ko, K.-C.; Kim, C.-S.; Chung, W.-I. Isolation and characterization of cDNA encoding  $\beta$ -carotene hydroxylase in Citrus. *Plant Sci.* **2001**, *161*, 1005-1010.
- (22) Barret, H. C.; Rhodes, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* **1976**, *1*, 105-136.
- (23) Ollitrault, P.; Faure, X.; Normand, F. Citrus rootstocks characterization with dark and leaf isozymes: application for distinguishing nucellar from zygotic trees. In *VIIIth International Citrus Congress*; 1992; pp 13-36.
- (24) Herrero, R.; Asins, M. J.; Carbonell, E. A.; Navarro, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 1. Intraspecific and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* **1996**, *92*, 599-609.
- (25) Herrero, R.; Asins, M. J.; Pina, J. A.; Carbonell, E. A.; Navarro, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 2. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* **1997**, *93*, 1327-1334.
- (26) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Cottin, R. La diversité des agrumes: structuration et exploitation par hybridation somatique. *C. R. Acad. Agric.* **2000**, *86*, 197-221.
- (27) Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; LaMalfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *100*, 1155-1166.
- (28) Webber, H. J. History and development of the citrus industry. In *The Citrus Industry. 1. History, World Distribution, Botany and Varieties*; Reuther, W., et al., Eds.; University of California Press: Berkeley, CA, 1967; pp 1-39.
- (29) Scora, R. W. On the history and origin of citrus. In 'Symposium on the biochemical systematics, genetics and origin of cultivated plants'. *Bull. Torrey Bot. Club* **1975**, *102*, 369-375.

- (30) Bain, J. M. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Bot.* **1958**, 6, 1-24.
- (31) Samson, J. A. Citrus. In *Tropical Fruits*, 2nd ed.; Longman Group: Essex, U.K., 1986; pp 73-138.
- (32) Davies, F. S.; Albrigo, L. G. Citrus. In *Crop Production Science in Horticulture*; CAB International: Wallingford, U.K., 1994; pp 202-254.
- (33) Britton, G.; Liaanen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy*; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 1995.
- (34) Ronen, G.; Cohen, M.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene  $\beta$ -cyclase is down-regulated during and is elevated in the mutant delta. *Plant J.* **1999**, 17, 341-351.
- (35) Bouvier, F.; Keller, Y.; d'Harlingue, A.; Camara, B. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum*). *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1391, 320-328.
- (36) Rouseff, R.; Raley, L. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2176-2181.

---

**Received for review October 27, 2005. Revised manuscript received April 14, 2006. Accepted April 21, 2006. We thank the Collectivité Territoriale de Corse for granting this study.**

JF0526644

## **III.2. ORIGINE DE LA DIFFERENCIATION PHENOTYPIQUE INTERSPECIFIQUE, ORIGINE PHYLOGENETIQUE DES GENES DE LA CHAÎNE DE BIOSYNTHESE, ROLE DE L'EXPRESSION DES GENES**

### **III.2.1. Origine phylogénétique des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes**

Nos premiers travaux sur la caractérisation phénotypique de 25 génotypes représentant les 8 espèces d'agrumes cultivées ont permis de mettre en évidence l'importance du facteur génétique dans la diversité des compositions en caroténoïdes. De plus, nous avons montré que le processus d'évolution des agrumes semble être le principal facteur d'organisation de cette diversité et que sur la base des compositions en caroténoïdes, les 25 génotypes se répartissent en trois groupes qui correspondent aux trois espèces de base des agrumes. Nous avons distingué les étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes qui paraissent impliquées dans la différenciation de ces trois groupes : étapes catalysées par PSY, LCY-b, LCY-e, HY-b et ZEP. Les travaux des paragraphes suivants analysent quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans la diversité des compositions en caroténoïdes des agrumes. En nous appuyant sur les résultats précédents et sur les données disponibles sur la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes, nous proposons que la diversité des allèles des gènes de biosynthèse des caroténoïdes et le niveau d'expression de ces gènes sont deux mécanismes essentiels dans la régulation de la biosynthèse des caroténoïdes chez les agrumes. De plus nous formulons l'hypothèse que la régulation au niveau transcriptionnel serait davantage impliquée dans la variation des compositions en caroténoïdes au niveau intraspécifique, cette variation étant quantitative. Dans ce deuxième article, nous analysons la diversité et l'origine phylogénétique des fragments d'ADN porteurs des principaux gènes de la chaîne de biosynthèse chez 25 génotypes et nous étudions les liens entre cette diversité et la variabilité phénotypique. Nous discutons principalement de ces liens pour les étapes clés distinguées dans notre première étude.

Titre : Origine phylogénétique de sept gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes chez les *Citrus*, est-ce un facteur de variation influençant la composition en caroténoïdes des jus ?

### **III.2.1.1...Résumé**

Le premier objectif de ce travail est de déterminer le nombre de copies des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez les agrumes. Le second est d'étudier la variabilité phylogénétique des fragments d'ADN porteurs de ces gènes pour finalement analyser les liens entre cette diversité allélique et la différenciation phénotypique interspécifique. Sept gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont été analysés par l'utilisation de marqueurs RFLP et SSR. Les analyses RFLP ont été réalisées sur l'ADN génomique de 25 génotypes appartenant au genre *Citrus* digéré par 3 enzymes de restriction. Des fragments d'ADN complémentaires des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* marqués au [ $\alpha$  -  $^{32}$ P] ont été utilisés comme sondes RFLP. Deux couples d'amorces amplifiant des motifs microsatellites présents dans les séquences codantes des gènes *Lcy-b* et *Hy-b* ont également été testés. Le nombre de copies des gènes étudiés varie de un pour le gène *Lcy-b* à au moins trois pour le gène *Zds*. La structuration de la diversité génétique des agrumes mise en évidence par ces analyses RFLP et SSR est en accord avec les organisations obtenues précédemment par l'utilisation de marqueurs moléculaires neutres. Cette structuration est aussi en accord avec l'hypothèse formulée sur l'histoire de l'évolution des agrumes cultivés. Nous avons ainsi proposé une reconstitution de la structure allélique des espèces secondaires à partir des allèles identifiés au sein des trois taxons de base pour quatre gènes : *Psy*, *Pds*, *Lcy-b* et *Lcy-e*. D'après ces dernières données, nous proposons que la variabilité allélique des gènes *Lcy-b* et *Lcy-e* codant pour les deux lycopènes cyclases est impliquée dans la variabilité de ces deux étapes de la voie de biosynthèse. En revanche, la diversité des autres étapes déterminantes dans la synthèse des caroténoïdes des agrumes catalysées par les enzymes PSY, HY-b et ZEP ne semble pas contrôlée par la présence d'allèles spécifiques.

### **III.2.1.2...Article**

**Titre :** Phylogenetic diversity of seven genes of the carotenoid biosynthetic pathway, in the *Citrus* genus; a variability factor influencing the carotenoid composition of juice?

FANCIULLINO, A. L.; DHUIQUE-MAYER, C.; LURO, F.; MORILLON, R.;

OLLITRAULT, P.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Article soumis.

## Phylogenetic diversity of seven genes of the carotenoid biosynthetic pathway in the *Citrus* genus; a variability factor influencing the carotenoid composition of juice?

ANNE-LAURE FANCIULLINO<sup>1</sup>, CLAUDIE DHUIQUE-MAYER<sup>2</sup>, FRANÇOIS LURO<sup>3</sup>, RAPHAËL MORILLON<sup>1</sup>, PATRICK OLLITRAULT<sup>1\*</sup>.

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, Avenue Agropolis - TA A-75 / 02 - 34398 Montpellier cedex 5, France; CIRAD, UMR QUALISUD Avenue J. F. Breton - TA B-95 / 16 - 34398 Montpellier Cedex 5, France; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) UR GEQA Site de San Giuliano, 20230 San Giuliano, France.

The first objective of this paper was to analyze the potential role of allelic variability of carotenoid biosynthetic genes in the interspecific diversity in carotenoid composition of *Citrus* juices. The second objective was to determine the number of copies of these genes. Seven carotenoid biosynthetic genes were analyzed using RFLP (restriction fragment length polymorphism) and SSR (simple sequence repeats) markers. RFLP analyses were performed with the genomic DNA from 25 *Citrus* genotypes using several restriction enzymes. cDNA fragments of *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* and *Zep* genes labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP were used as probes. For SSR analyses, two primer pairs amplifying two microsatellite sequences identified from ESTs of *Lcy-b* and *Hy-b* genes were designed. The number of copies of the seven genes ranged from one for *Lcy-b* to three for *Zds*. The global genetic diversity revealed by the RFLP and SSR profiles was in agreement with the genetic diversity obtained from neutral molecular markers. Genetic interpretation of RFLP and SSR profiles of four genes (*Psy1*, *Pds1*, *Lcy-b*, *Lcy-e1*) enabled us to make inferences on the phylogenetic origin of alleles for the major commercial citrus species. Moreover, the results of our analyses suggest that the allelic diversity observed at the locus of the two lycopene cyclase genes *Lcy-b* and *Lcy-e1*, is associated with interspecific diversity in carotenoid accumulation in *Citrus*. The interspecific differences in carotenoid contents previously reported to be associated with other key steps catalyzed by PSY, HY-b and ZEP, were not linked to specific alleles at the corresponding loci.

**KEYWORDS:** *Citrus*, carotenoids, biosynthetic genes, allelic variability, *Citrus* phylogeny, regulation mechanisms.

### INTRODUCTION

Carotenoids are pigments common to all photosynthetic organisms. In pigment-protein complexes, they act as light sensors for photosynthesis but also prevent photo-oxidation induced by too strong light intensities (1). In horticultural crops they play a major role in fruit, root or tuber coloration (2) and in nutritional quality. Indeed some of these micronutrients are precursors of vitamin A, an essential component of human and animal diets (3). Carotenoids also help prevent chronic diseases such as certain cancers, probably due to their antioxidant properties (4-5).

The carotenoid biosynthetic pathway is now well established (6-7, **Figure 1**). Carotenoids are synthesized in plastids by nuclear-encoded enzymes (7). The immediate precursor of carotenoids (and also of gibberellins, plastoquinone, chlorophylls, phyloquinones, and tocopherols) is geranylgeranyl diphosphate (GGPP). In light grown-plants, GGPP is mainly derived from the methylerythritol phosphate (MEP) pathway (8-9, **Figure 1**). The condensation of two

molecules of GGPP catalyzed by phytoene synthase (PSY) leads to the first colourless carotenoid: 15-*cis*-phytoene. Sequences of the *Psy* gene have been isolated and sequenced in several plant species including from *Citrus* varieties (10). Phytoene undergoes four desaturation reactions catalyzed by two enzymes, phytoene desaturase (PDS) and  $\zeta$ -carotene desaturase (ZDS), which convert phytoene into the red-coloured poly-*cis*-lycopene. The coding sequences of these two genes are available in databases (10). Recently, Isaacson *et al.* (11) and Park *et al.* (12) isolated the gene that encodes the carotenoid isomerase (CRTISO) which, in turn, catalyzes the isomerization of poly-*cis*-carotenoids into all-*trans*-carotenoids. CRTISO acts on prolycopene to form all-*trans* lycopene which undergoes cyclization reactions. Cyclization of lycopene is a branching point: one branch leads to  $\beta$ -carotene ( $\beta$ , $\beta$ -carotene) and the other to  $\alpha$ -carotene ( $\beta$ , $\epsilon$ -carotene). Lycopene  $\beta$ -cyclase (LCY-b) then converts lycopene into  $\beta$ -carotene in two steps, whereas the formation of  $\alpha$ -carotene requires the action of two enzymes, lycopene  $\epsilon$ -cyclase (LCY-e) and lycopene  $\beta$ -cyclase (LCY-b) (13). *Lcy-b* genes have been identified in several species including *Citrus* (10, 14). The full coding sequence of *Lcy-e* gene has been isolated and sequenced in *Citrus* (14). Alpha-carotene is converted into lutein by hydroxylations catalyzed by  $\epsilon$ -carotene hydroxylase (HY-e) and  $\beta$ -carotene hydroxylase (HY-b). Other xanthophylls are produced from  $\beta$ -carotene with hydroxylation reactions catalyzed by HY-b

\*Author to whom correspondence should be addressed [Tel: +33-(0)467615971; Fax: +33-(0)467615666; e-mail patrick.ollitault@cirad.fr]

<sup>1</sup> Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative.

<sup>2</sup> Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, UMR QUALISUD

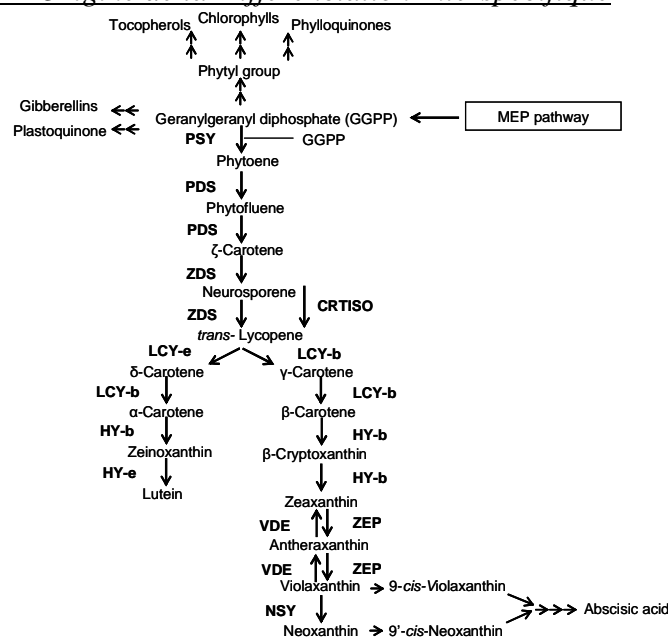
<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) UR GEQA.



and epoxydation catalyzed by zeaxanthin epoxidase (ZEP). In *Citrus*, two cDNA clones encoding HY-b have been isolated. These two clones, which displayed the same Southern blot pattern (one to three bands obtained with three restriction enzymes) and the same expression pattern, were alleles of one gene (15). The *Zep* gene has been isolated and sequenced in several species (10). Thus, carotenoid biosynthetic genes have been cloned and sequenced in *Citrus* varieties. However, our knowledge of the complex regulation of carotenoid biosynthesis in *Citrus* fruits is still limited. We need further information on the number of copies of these genes and on their allelic diversity in *Citrus* as these can influence carotenoid composition within the *Citrus* genus.

*Citrus* fruits are among the richest sources of carotenoids. The fruits generally display a complex carotenoid structure and 115 different carotenoids have been identified in *Citrus* fruits (16-24). The carotenoid richness of *Citrus* flesh depends on environmental conditions, particularly on growing conditions (16), and on geographical origin (17). Hot tropical conditions are favourable for red *Citrus* varieties like red grapefruits, pummelos and some sweet oranges which produce high levels of lycopene, while in other cultivars, Mediterranean conditions lead to higher total carotenoid content (17-18). However the main factor influencing variability of carotenoid quality in juice has been shown to be genetic diversity. Kato *et al.* (19) showed that mandarin and orange juices accumulated high levels of  $\beta$ -cryptoxanthin and violaxanthin respectively, whereas mature lemon accumulated extremely low levels of carotenoids. Goodner *et al.* (20) demonstrated that mandarins, oranges, and their hybrids could be clearly distinguished by their  $\beta$ -cryptoxanthin contents. Juices of red grapefruits contained two major carotenoids: lycopene and  $\beta$ -carotene (21-22). More recently, we conducted a broad study on the organisation of the variability of carotenoid contents in different cultivated *Citrus* species in relation with the biosynthetic pathway (23). Qualitative analysis of presence or absence of the different compounds revealed three main clusters: 1: mandarins, sweet oranges and sour oranges; 2: citrons, lemons and limes; 3: pummelos and grapefruits. Our study also enabled identification of key steps in the diversification of the carotenoid profile. Synthesis of phytoene appeared as a limiting step for acid *Citrus* (cluster 2) while formation of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -carotene from lycopene were dramatically limited in cluster 3 (pummelos and grapefruits). Only varieties in cluster 1 were able to produce violaxanthin.

In the same study (23) we concluded that there was a very strong correlation between the organisation of diversity with respect to carotenoid quality and genetic diversity evaluated with neutral molecular markers such as isozymes (25) or RFLP (26). We also concluded that, at the interspecific level, the organization of the diversity of carotenoid composition was linked to the global evolution process of cultivated *Citrus* rather than to more recent mutation events or human selection processes. Indeed, at interspecific level, a correlation between phenotypic variability and genetic diversity is common and is generally associated with generalized gametic disequilibrium resulting from the evolution of cultivated *Citrus* evolution (25). Thus from numerical taxonomy based on morphological traits (27) or from analysis of



**Figure 1.** Carotenoid biosynthetic pathway in plants. MEP pathway, methylethylthiol phosphate pathway. PSY, phytoene synthase. PDS, phytoene desaturase. ZDS,  $\zeta$ -carotene desaturase. CRTISO, carotenoid isomerase. LCY-e, lycopene  $\epsilon$ -cyclase. LCY-b, lycopene  $\beta$ -cyclase. HY-b,  $\beta$ -carotene hydroxylase. HY-e,  $\epsilon$ -carotene hydroxylase. ZEP, zeaxanthin epoxidase. VDE, violaxanthin de-epoxidase. NSY, neoxanthin synthase.

molecular marker (25-26, 28) all authors agreed on the existence of three basic taxa (*C. reticulata*, mandarins; *C. medica*, citrons; and *C. maxima*, pummelos) whose differentiation was the result of allopatric evolution. All other cultivated *Citrus* species (*C. sinensis*, sweet oranges, *C. aurantium*, sour oranges, *C. paradisi*, grapefruits and *C. limon*, lemons) resulted from hybridization events within this basic pool except for *C. aurantifolia* which may be a hybrid between *C. medica* and *C. micrantha* (26). Below, all the above mentioned species are referred to as secondary species. Moreover it appears that only mutational (or epigenetic) events were involved in the diversification of secondary species such as *C. sinensis*, *C. aurantium* or *C. paradisi* (25) while in the three basic taxa displaying monoembryonic varieties, intraspecific diversity may have resulted from sexual recombination combined with mutational events.

Our previous results (23) and data on *Citrus* evolution, lead us to propose the hypothesis that the molecular variability supporting the organization of carotenoid diversity at interspecific level preceded events that resulted in the creation of secondary species. Such molecular variability may have two different effects: on the one hand, variability of the gene sequence affects the specific activity of corresponding enzymes of the biosynthetic pathway, and, on the other hand, variability affects the expression of these genes.

The relationship between carotenoid profiles of different *Citrus* species and biosynthetic gene expression has only been investigated by Kato *et al.* (19, 29). These authors compared three *Citrus* species, "Satsuma" mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), "Valencia" orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and "Lisbon" lemon (*Citrus limon* Burm. f.), and showed that the differential carotenoid accumulation between the three species was

closely related to the expression of the carotenoid biosynthetic genes (*CitPSY*, *CitPDS*, *CitZDS*, *CitLCYb*, *CitHYb*, and *CitZEP*). The transcriptional regulation of biosynthetic genes was not the only mechanism shown to be involved in the differential accumulation of carotenoid in *Citrus* fruits. Post-transcriptional regulations were also shown to be involved, including changes in enzyme activity due to specific alleles (15, 29).

At the time of writing, there is no available data on the allelic diversity of *Citrus* genes of the carotenoid biosynthetic pathway. The objective of this paper was to test the hypothesis that allelic variability of these genes partially determines phenotypic variability at the interspecific level. For this purpose, we analysed the RFLPs around seven genes of the biosynthetic pathway of carotenoids (*Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b*, *Zep*) in a representative set of varieties of the *Citrus* genus already analysed for carotenoid constitution. Our study aimed to answer the following questions: (a) are the genes mono or multilocus? (b) is the polymorphism of RFLP and SSR markers around these genes in agreement with the general history of cultivated *Citrus* thus permitting identification of the phylogenetic origin of genes of the secondary species? (c) is this polymorphism associated with phenotypic (carotenoid compound) variations?

**Table 1.** Genotypes used for RFLP and SSR analyses.

n°	common name	Tanaka system	ICVN number <sup>a</sup>
1	Willowleaf mandarin	<i>C. deliciosa</i> Ten.	ICVN 0100133
2	Wase Satsuma	<i>C. unshiu</i> Marc.	ICVN 0100230
3	Hansen mandarin	<i>C. reticulata</i> Blanco	ICVN 0100357
4	Seedless pummelo	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	ICVN 0100710
5	Deep Red pummelo	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	ICVN 0100757
6	Chandler pummelo	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	ICVN 0100608
7	Etrog citron	<i>C. limonimediterranea</i> L.	ICVN 0100130
8	Diamante citron	<i>C. medica</i> L.	ICVN 0100540
9	Marsh grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf.	ICVN 0100188
10	Star Ruby grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf.	ICVN 0100293
11	Ray Ruby grapefruit	<i>C. paradisi</i> Macf.	ICVN 0100604
12	Shamouti orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	ICVN 0100299
13	Sanguinelli orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	ICVN 0100243
14	Cara Cara navel orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	ICVN 0100666
15	Morocco sour orange	<i>C. aurantium</i> L.	ICVN 0110033
16	Bouquetier de Nice	<i>C. aurantium</i> L.	ICVN 0100688
17	Myrtle-leaf orange	<i>C. myrtifolia</i> Raf.	ICVN 0100708
18	Eureka Frost lemon	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	ICVN 0100004
19	Volkamer lemon	<i>C. limonia</i> Osbeck	ICVN 0100729
20	Meyer lemon	<i>C. meyeri</i> Yu. Tan.	ICVN 0100549
21	Rangpur lime	<i>C. limonia</i> Osbeck	ICVN 0110050
22	Mexican lime	<i>C. auratifolia</i> (Christm.) Swing.	ICVN 0100140
23	Palestine sweet lime	<i>C. limettoides</i> Tan.	ICVN 0100802
24	Clementine	<i>C. clementina</i> hort. ex Tan.	ICVN 0100092
25	Huang pi Chen orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	ICVN 0100567

<sup>a</sup>International Citrus Variety Numbering

## MATERIELS AND METHODS

**RFLP analysis.** Genomic DNA was isolated from leaves of 25 *Citrus* genotypes (table 1). Leaves were provided by the germplasm collection of the “Station de Recherche Agronomique” in San Giuliano, Corsica. Total DNA extraction was performed according to Doyle & Doyle (1987) (30) from 0.5 g of leaf tissue. The DNA was quantified by measuring the increased fluorescence of the Hoechst dye 33258. Total DNA (10 µg) was digested with *EcoRV*, *BamHI*, and *HindIII*, electrophoresed on 1 % agarose gels, and blotted onto

nylon membranes (Hybond-N, Amersham, UK) according to the manufacturer's recommendations.

To prepare probes, cDNA fragments of carotenoid biosynthetic genes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, *Zep* and *Lcy-e* were obtained by PCR using Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cDNA as a template and specific primers. Total RNA was isolated from fruits of Satsuma mandarin as described by Manning (31). UV absorption spectrophotometry and gel electrophoresis were performed to test RNA quality as described by Sambrook *et al.* (32). First-strand cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas). Primer pairs were designed from *Citrus Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, *Zep* and *Lcy-e* full coding sequences deposited in the database (GenBank accession numbers AF220218, AB046992, AB072343, AY166796, AF315289, AB075547, and AY533827) (for primer sequences and cDNA fragment length see table 2). The amplified fragments were separated by electrophoresis on 1 % agarose gel and purified with GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham, UK). The identity of all cDNA fragments was confirmed by sequencing (MWG, Martinsried, Germany). The cDNA fragments were labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Megaprime DNA Labelling System, Amersham, UK). In order to screen the presence of intronic sequences and restriction sites in genomic DNA corresponding to RFLP probes, amplifications were performed with genomic DNA using primer pairs described in Table 2. Aliquots of PCR products were purified with GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham, UK) and digested with *EcoRV*, *BamHI* and *HindIII*. Digestions were carried out overnight at 37°C in a total volume of 200 µL with 40 units of restriction enzyme (Invitrogen), the 1X corresponding reaction buffer, and 10 µg of DNA. PCR and digestion products were separated by electrophoresis on 1 % agarose gel.

Membranes were prehybridized at 65°C for 4-5 h in 50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 5X SSC, 0.2 % SDS, 1X Denhardt's solution, and 100 µg mL<sup>-1</sup> denatured salmon sperm DNA. Hybridization was carried out at 65°C overnight in 50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 5X SSC, 0.2 % SDS, 1X Denhardt's solution, 100 µg mL<sup>-1</sup> denatured salmon sperm DNA and 10 % Dextran sulphate. Membranes were washed once at room temperature in 0.5X SSC and 0.1 % SDS, once at 65°C for 30 min in 0.5X SSC and 0.1 % SDS, and once at 65°C for 30 min in 0.25X SSC and 0.1 % SDS. Membranes were exposed to X-ray film (Biomax MS Film, Kodak).

**SSR Analysis.** Aliquots of total genomic DNA extracted for Southern Blot analysis from leaves of 25 genotypes were used for SSR analysis.

Microsatellite sequences were screened from a *Citrus* EST library which contained carotenoid biosynthetic genes (Terol *et al.*, 2007) (33). Two EST microsatellite sequences were found: one corresponded to the *Lcy-b* gene and another one to the *Hy-b* gene. Two primer pairs, flanking the SSR motifs, were designed: 1210 and 1388 (see table 3) (33). These two primer pairs were used for SSR analysis and nuclear microsatellite amplifications. PCR amplifications of the samples were performed using a PTC-200 thermocycler (MJ Research Inc.) in 15 µL final volume containing 0.8U of *Taq* DNA polymerase (Eurogentec) and corresponding 1X reaction buffer, 10

ng of *Citrus* genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM forward primer and 0.2 µM reverse primer. The following PCR programme was applied: denaturation at 94°C for 5 min and 35 repeats of the following cycle: 30 s at 94°C, 1 min at 55 or 60°C, 45 s at 72°C; and a final elongation step of 4 min at 72°C. Samples were then kept at 4°C prior to analysis. After adding 15 µL of loading buffer [98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.25 % (w/v) bromophenol blue, 0.25 % (w/v) xylene cyanol], the mixture was denatured at 92°C for 3 min and kept at 70°C during gel loading. 6 µL of each sample were loaded in 5 % denaturing polyacrylamide (19:1 acrylamide:bisacrylamide) gels with 7.5 M urea in 0.5 % TBE buffer prior to electrophoresis at 60 W for 2 h. Gels were silver stained using an improved method adapted from Beidler *et al.* (1982) (34).

**Data analysis.** To examine the organization of genetic diversity within the 25 genotypes, Neighbor-joining trees were determined with @DARwin 4.0 software (CIRAD Montpellier, France). Dice matrixes of dissimilarity were calculated from presence/absence of RFLP or SSR bands from patterns of the seven genes.

**Table2.** List of primers used for cDNA amplification and RFLP analysis

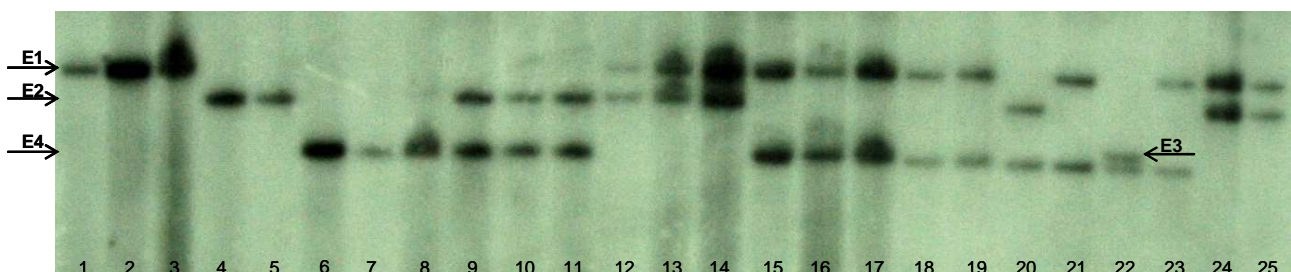
Gene	Primer	Amplicon size
Psy_1 Forward	5'-GGGTTGTATCACCTAAC-3'	397 pb
Psy_1 Reverse	5'-CTTAAAGTTCGGGT-3'	
Pds_1 Forward	5'-CAACTTGCGATATGGTT-3'	588 pb
Pds_1 Reverse	5'-TTCACCTTTCTCCGGC-3'	
Zds_1 Forward	5'-TTCTTCAGTTCTGTTTCCT-3'	557 pb
Zds_1 Reverse	5'-GAGCATTTCTTGCTTTATC-3'	
Lcy-b_1 Forward	5'-TCTTGCCCAAGTTC-3'	498 pb
Lcy-b_1 Reverse	5'-TTTTCGACTTCAGCAAC-3'	
Hyb_1 Forward	5'-ATGCACGAGTCTCACC-3'	382 pb
Hyb_1 Reverse	5'-TTCTCTTACTGATCTCCTTCT-3'	
Zep_1 Forward	5'-CAGTTAATCTTTCAACAGC-3'	635 pb
Zep_1 Reverse	5'-CTTATCTCCATGATCCTTA-3'	
Lcy-e_1 Forward	5'-GCTCCAACTATGCTTC-3'	343 pb
LCY-e_1 Reverse	5'-GTCTGATAAGGCACTTTCT-3'	

**Table 3.** Primers used for SSR analysis.

Primer	Putative function	Primer sequence	Observed product size
1210 Forward	lycopene β-cyclase	5'-GCCAAATGCATGTTCAAGA-3'	174-183 pb
1210 Reverse		5'-GTGCCAATGATGATCAGTC-3'	
1388 Forward	β-carotene hydroxylase	5'-AAACAAAGCACCCAGATCG-3'	133-142 pb
1388 Reverse		5'-ACGGCAGCAACGAGATAAGT-3'	

## RESULTS

**Global diversity observed by RFLP analysis.** RFLPs analyses were performed using probes defined from expressed sequences of seven major genes of the carotenoid biosynthetic pathway (**figure 1**). One or two restriction enzymes were used for each gene. None of these enzymes cut the EST probe sequence except *HindIII* for the *Lcy-e* gene. Intronic sequences and restriction sites on genomic sequences were screened with PCR amplification using genomic DNA as template and with digestion of PCR products. The results indicated the absence of an intronic sequence for *Psy* and *Lcy-b*. Conversely, we found introns in *Pds*, *Zds*, *Hy-b*, *Zep*, and *Lcy-e* genomic sequences corresponding to RFLP probes. *EcoRV* did not cut the genomic sequences of *Pds*, *Zds*, *Hy-b*, *Zep* and *Lcy-e*. In the same way, no *BamHI* restriction site was found in the genomic sequences *Pds*, *Zds*, and *Hy-b*. An example of RFLP gel is given in **Figure 2** for the combination *EcoRV* / *Lcy-b*. Data relative to the global diversity observed for the different genes are presented in **Table 4**. A total of 58 fragments were identified, six of them being monomorphic (present in all individuals). In the limited sample of the three basic taxa, only eight bands out of 58 could not be observed. In the basic taxa, the mean number of bands per genotype observed was 24.7, 24.7 and 17 for *C. reticulata*, *C. maxima* and *C. medica* respectively. It varies from 28 (*C. limettioides*) to 36 (*C. aurantium*) for the secondary species. The four sweet oranges analyzed displayed the same profiles for all genes as did the three representatives of *C. aurantium* and the three grapefruits. In the following analysis, each of these three secondary species is represented by only one individual. The global organisation of genetic diversity displayed on the Neighbor-joining tree based on the Dice dissimilarity index from the presence / absence of bands observed for all RFLP markers is given in **Figure 3**. Eighteen different profiles were differentiated. Three main clusters were identified; the first grouped mandarins and sweet oranges, the second pummelos and grapefruits, and the third citrons and most of the acid *Citrus*. The two lemons were close to the acid *Citrus* cluster and the three sour oranges close to the mandarins / sweet oranges cluster. This organisation is in complete agreement with the phylogenetic organisation of the *Citrus* genus previously described with neutral markers as well as the organisation obtained with qualitative carotenoid compositions. It seems consistent with our basic hypothesis that major



**Figure 2.** RFLP hybridization pattern for the combination *EcoRV* / *Lcy-b*. 10 µg of genomic DNA from 25 *Citrus* genotypes (numbers are identified in table 1) were digested with *EcoRV*. The arrows indicate the different fragments (E1, E2, E3, and E4) characterized in gene by gene analysis.

differentiation in the genes involved in the carotenoid biosynthetic pathway preceded the creation of the secondary hybrid species and thus that the allelic structure of these hybrids species can be reconstructed from alleles observed in the three basic taxa.

**Gene by gene analysis: the *Psy* gene.** For the *Psy* probe combined with *EcoRV* or *BamHI* restriction enzymes, five bands were identified for the two enzymes and two to three bands were observed for each genotype. One of these bands was present in all individuals. There was no restriction site in the probe sequence. These results lead us to believe that *Psy* is present at two loci, one where no polymorphism was found with the restriction enzymes used, and one that displayed polymorphism. The number of different profiles observed was six and four with *EcoRV* and *BamHI* respectively for a total of 10 different profiles among the 25 individuals (**Table 4**).

Among the four polymorphic bands for *EcoRV* we found:

- one band (E1) common to all mandarins, “Seedless” pummelo, all grapefruits, all sweet oranges, all sour oranges, “Eureka” lemon, “Meyer” lemon and clementine;
- one band (E2) common to “Willow leaf” mandarin, “Deep red” pummelo, all grapefruits, all sweet oranges, sour oranges and clementine;
- one band (E3) common to citrons and all acid *Citrus*;
- one rare band (E4) only present in “Chandler” pummelo.

Among the four polymorphic bands for *BamHI* we

found:

- one (B1) band common to all genotypes excepted “Satsuma” mandarin and “Seedless” pummelo;
- one (B2) rare band only present in “Seedless” pummelo;
- one (B3) rare band only present in “Satsuma” mandarin;
- one (B4) band common to “Seedless” and “Deep Red” pummelos, all grapefruits, sweet oranges, sour oranges and “Eureka” lemon.

All these bands were observed in basic taxon genomes. Assuming the hypothesis that all these bands describe the polymorphism at the same locus for the *Psy* gene, we can conclude that for the three basic species we identified the following alleles:

*C. reticulata* :

- *Psy1\_1*: E1B1
- *Psy1\_2*: E2B1
- *Psy1\_3*: E1B3

*C. maxima*:

- *Psy1\_4*: E1B4
- *Psy1\_5*: E2B4
- *Psy1\_6*: E2B2
- *Psy1\_7*: E4B1

*C. medica*:

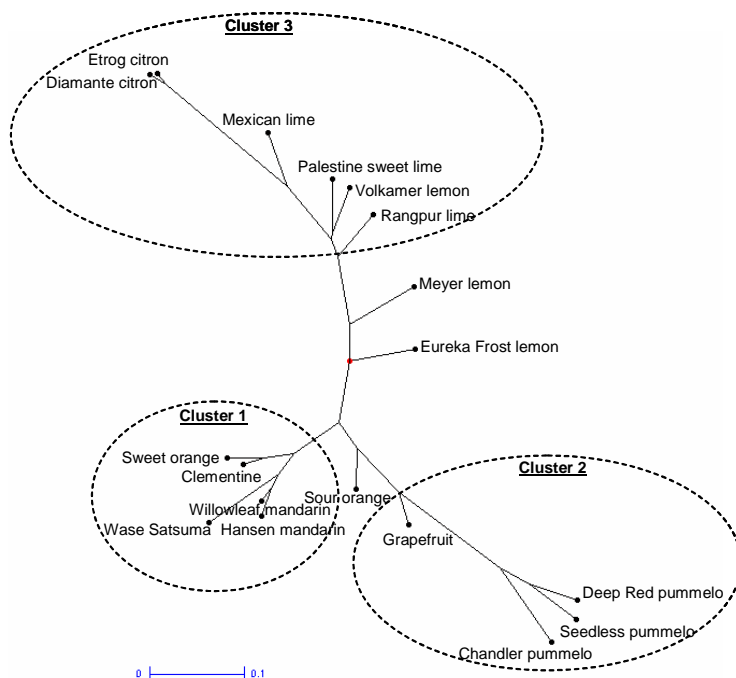
- *Psy1\_8*: E3B1

We found allelic differentiation between the three basic taxa with three alleles for *C. reticulata*, four for *C. maxima* and one for *C. medica*. The alleles observed for the basic taxa then enabled us to determine the genotypes of all the other species. The presumed genotypes for the *Psy* polymorphic locus are given in **Table 5**. Sweet oranges and grapefruits were heterozygous (*Psy1\_1* / *Psy1\_5*) with one mandarin and one pummelo allele. Sour oranges were heterozygous (*Psy1\_1* / *Psy1\_4*), they shared the same mandarin allele with sweet oranges but had a different pummelo allele. Clementine was heterozygous (*Psy1\_1* / *Psy1\_2*) with two mandarin alleles; one shared with sweet oranges (*Psy1\_1*) and one with “Willow leaf” mandarin. “Meyer” lemon was heterozygous (*Psy1\_1* / *Psy1\_8*), with the mandarin allele also found in sweet oranges, and the citron allele. “Eureka” lemon was also heterozygous with the same pummelo allele as sour oranges (*Psy1\_4*) and the citron allele (*Psy1\_8*). The other acid *Citrus* were homozygous for the citron allele.

**The *Pds* gene.** For the *Pds* probe combined with *EcoRV*, six different fragments were observed. One was common to all individuals. The number of fragments per individual was two or three. Results for *Pds* led us to believe that this gene is present at two loci, one where no polymorphism was found with *EcoRV* restriction, and one displaying polymorphism. Different height profiles were observed.

Among the five polymorphic fragments we observed:

- one band (E1) shared by mandarins, sweet and sour oranges, clementine, “Eureka” lemon, “Rangpur” lime and “Palestine sweet” lime;
- one rare band (E2) only observed in “Volkamer” lemon;
- one band (E3) shared by the three pummelos, sweet and sour oranges, grapefruits, “Meyer” lemon and clementine;



**Figure 3.** Global organisation of genetic diversity based on RFLP markers defined from expressed sequences of seven carotenoid biosynthetic genes. The tree was constructed according to the Neighbor-Joining method using a Dice matrix of dissimilarity.

**Table 4.** Global description of RFLP profiles observed using cDNA of seven genes of the carotenoid biosynthetic pathway as probes.

Gene	Restriction enzyme	Total number of fragments	Number of monomorphic fragments	Minimum number of fragments/individual	Maximum number of fragments/individual	Number of fragments/C. reticulata	Number of fragments/C. maxima	Numbers of fragments/C. medica	Number of fragments not observed in basic taxa	Number of profiles	Number of profiles /gene
Psy	EcoRV	5	1	2	3	3	3	2	0	6	10
	BamHI	5	1	2	3	3	4	2	0	4	
Pds	EcoRV	6	1	2	3	2	2	2	2	8	8
Zds	EcoRV	9	1	2	6	4	5	2	2	11	13
	BamHI	5	1	3	5	3	4	3	0	7	
Lcy-b	EcoRV	4	0	1	2	1	2	1	1	7	7
Hy-b	EcoRV	4	0	1	2	2	2	1	0	6	8
	BamHI	2	1	1	2	1	2	1	0	2	
Zep	EcoRV	7	0	2	4	4	3	2	1	10	10
Lcy-e	EcoRV	5	0	1	3	2	1	1	1	3	10
	HindIII	6	0	1	5	3	1	1	1	9	

**Table 5.** Proposed genotypes and proposed phylogenetic origin of carotenoid biosynthetic genes of hybrid *Citrus* species

Gene	Psy1		Pds1		Lcy-b		Lcy-e1	
Data used	EcoRV + BamHI		EcoRV		EcoRV + SSR		EcoRV	
	Genotype	Phylogenetic origin	Genotype	Phylogenetic origin	Genotype	Phylogenetic origin	Genotype	Phylogenetic origin
<i>C. reticulata</i> cv Willow leaf	Psy1_1 /Psy1_2 <sup>a</sup>	M/M <sup>b</sup>	Pds1_1 /Pds1_1	M/M	Lcy-b_1 /Lcy-b_1	M/M	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_4	M/M
<i>C. reticulata</i> cv Satsuma	Psy1_3 /Psy1_3	M/M	Pds1_1 /Pds1_1	M/M	Lcy-b_1 /Lcy-b_2	M/M	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_4	M/M
<i>C. reticulata</i> cv Hansen	Psy1_1 /Psy1_1	M/M	Pds1_1 /Pds1_1	M/M	Lcy-b_1 /Lcy-b_1	M/M	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_4	M/M
<i>C. maxima</i> cv seedless	Psy1_4 /Psy1_6	P/P	Pds1_2 /Pds1_2	P/P	Lcy-b_3 /Lcy-b_3	P/P	Lcy-e1_2 /Lcy-e1_2	P/P
<i>C. maxima</i> cv Deep red	Psy1_5 /Psy1_5	P/P	Pds1_2 /Pds1_2	P/P	Lcy-b_3 /Lcy-b_3	P/P	Lcy-e1_2 /Lcy-e1_2	P/P
<i>C. maxima</i> cv Chandler	Psy1_7 /Psy1_7	P/P	Pds1_2 /Pds1_2	P/P	Lcy-b_4 /Lcy-b_4	P/P	Lcy-e1_2 /Lcy-e1_2	P/P
<i>C. medica</i> cv Etrog	Psy1_8 /Psy1_8	C/C	Pds1_3 /Pds1_3	C/C	Lcy-b_6 /Lcy-b_6	C/C	Lcy-e1_1 /Lcy-e1_1	C/C
<i>C. medica</i> cv Diamante	Psy1_8 /Psy1_8	C/C	Pds1_3 /Pds1_3	C/C	Lcy-b_5 /Lcy-b_6	C/C	Lcy-e1_1 /Lcy-e1_1	C/C
<i>C. sinensis</i>	Psy1_1 /Psy1_5	M/P	Pds1_1 /Pds1_2	M/P	Lcy-b_1 /Lcy-b_3	M/P	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_4	M/M
<i>C. aurantium</i>	Psy1_1 /Psy1_4	M/P	Pds1_1 /Pds1_2	M/P	Lcy-b_1 /Lcy-b_4	M/P	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_2	M/P
<i>C. paradisi</i>	Psy1_1 /Psy1_5	M/P	Pds1_2 /Pds1_2	P/P	Lcy-b_3 /Lcy-b_4	P/P	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_2	M/P
<i>C. limon</i>	Psy1_4 /Psy1_8	P/C	Pds1_1 /Pds1_3	M/C	Lcy-b_1 /Lcy-b_6	M/C	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_1	M/C
<i>C. limonia</i>	Psy1_8 /Psy1_8	C/C	Pds1_3 /Pds1_4	C/? <sup>c</sup>	Lcy-b_1 /Lcy-b_5	M/C	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_1	M/C
<i>C. meyeri</i>	Psy1_1 /Psy1_8	M/C	Pds1_2 /Pds1_3	P/C	Lcy-b_1 /Lcy-b_6	M/C	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_1	M/C
<i>C. limonia</i>	Psy1_8 /Psy1_8	C/C	Pds1_1 /Pds1_3	M/C	Lcy-b_1 /Lcy-b_6	M/C	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_1	M/C
<i>C. aurantifolia</i>	Psy1_8 /Psy1_8	C/C	Pds1_3 /Pds1_5	C/?	Lcy-b_7 /Lcy-b_5	?/C	Lcy-e1_3 /Lcy-e1_1	?/C
<i>C. limettoides</i>	Psy1_8 /Psy1_8	C/C	Pds1_1 /Pds1_3	M/C	Lcy-b_1 /Lcy-b_6	M/C	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_1	M/C
<i>C. clementina</i>	Psy1_1 /Psy1_2	M/M	Pds1_1 /Pds1_2	M/P	Lcy-b_1 /Lcy-b_3	M/P	Lcy-e1_4 /Lcy-e1_4	M/M

<sup>a</sup> For each carotenoid biosynthetic gene, loci and alleles are identified as follows: Psy1\_1 for the allele 1 of the locus 1 of *Psy* gene. <sup>b</sup> M, mandarin (*C. reticulata*). P, pummelo (*C. maxima*). C, citron (*C. medica*). <sup>c</sup> ?, specific allele not observed in the three basic taxa.

- one rare band (E4) only observed in “Mexican” lime;
- one band (E5) shared by citrons and all acid *Citrus*;

Assuming that the polymorphic bands are related to the same locus, we observed a strong differentiation between the three basic taxa with the following alleles:

*C. reticulata*:

- Pds1\_1: E1

*C. maxima*:

- Pds1\_2: E3

*C. medica*:

- Pds1\_3: E5

All the genotypes of the basic taxa were homozygous and no polymorphism was found at intraspecific level. Two additional alleles were observed in “Volkamer” lemon (*Pds1\_4*: E2) and “Mexican” lime (*Pds1\_5*: E4). Genotypes of secondary species are given in **Table 5**. Sweet oranges, clementine and sour oranges were heterozygous (*Pds1\_1* / *Pds1\_2*) with the mandarin and



the pummelo allele. Grapefruits were homozygous (*Pds1\_2* / *Pds1\_2*) for the pummelo allele. “Eureka” lemon, “Rangpur” lime and “Palestine sweet” lime were heterozygous (*Pds1\_1* / *Pds1\_3*) with the mandarin and the citron allele. “Meyer” lemon was heterozygous (*Pds1\_2* / *Pds1\_3*) with the pummelo and the citron allele. “Volkamer” lemon and “Mexican” lime were also heterozygous with the citron allele and their specific alleles.

**The *Zds* gene.** The *Zds* profiles were complex. Respectively nine and five fragments were observed with *EcoRV* and *BamHI* restriction. For both enzymes, one fragment was common to all individuals. The number of fragments per individual ranged from two to six for *EcoRV* and three to five for *BamHI*. There was no restriction site in the probe sequence. It can be assumed that several copies (at least three) of the *Zds* gene are present in the *Citrus* genome with polymorphism at at least two of them. In these conditions and in the absence of analysis of controlled progenies, we are unable to conduct genetic analysis of profiles. However it appears that some bands have differentiated from the basic taxa: one for mandarins, one for pummelos and one for citrons with *EcoRV* restriction and one for pummelos and one for citrons with *BamHI* restriction. Two bands out of the nine obtained with *EcoRV* were not observed in the samples of basic taxa. One was rare and only observed in “Rangpur” lime while the other was found in sour oranges, “Volkamer” lemon and “Palestine sweet” lime suggesting a common ancestor for these genotypes.

**The *Lcy-b* gene with RFLP analysis.** After restriction with *EcoRV* and hybridisation with the *Lcy-b* probe we obtained simple profiles with a total of four fragments (figure 2). One to two fragments were observed for each individual and seven profiles were differentiated among the 25 genotypes. These results provide evidence that *Lcy-b* is present at a single locus in the *Citrus* genome.

The four bands were shared in the following way:

- E1 was shared by the three mandarins, all sweet and sour oranges, clementine, “Eureka” and “Volkamer” lemons, “Rangpur” and “Palestine sweet” limes;
- E2 was shared by “Seedless” and “Deep Red” pummelos, all grapefruits and sweet oranges, clementine and “Meyer” lemon;
- E3 was specific to “Mexican” lime;
- E4 was shared by “Chandler” pummelo, all citrons, grapefruits and sour oranges and all acid *Citrus*.

**The *Lcy-b* gene with SSR analysis.** Four bands were detected at locus 1210 (*Lcy-b* gene) (figure 4). One or two bands were detected per variety confirming that this gene is monolocus. Six different profiles were observed among the 25 genotypes. As with RFLP analysis, no intra-taxon molecular polymorphism was found within *C. paradisi*, *C. sinensis* and *C. aurantium*.

The four bands were shared as follows:

- S1 was shared by “Diamante” citron, “Volkamer” lemon and “Mexican” lime;
- S2 was shared by the two citrons, “Eureka” and “Meyer” lemons, “Rangpur” and “Palestine sweet” limes;
- S3 was common to all individuals except citrons;
- S4 was specific to “Satsuma” mandarin.

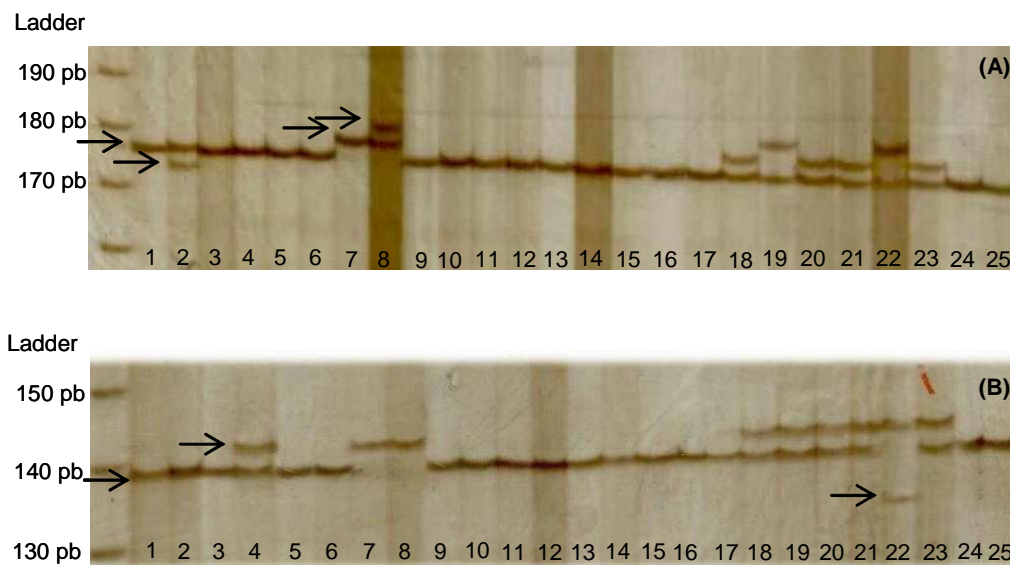
Taken together, the information obtained from RFLP and SSR analyses enabled us to identify the following alleles for the *Lcy-b* gene in the basic taxon samples:

*C. reticulata*

- *Lcy-b\_1*: E1S3
- *Lcy-b\_2*: E1S4

*C. maxima*

- *Lcy-b\_3*: E2S3
- *Lcy-b\_4*: E4S3



**Figure 4.** Silver-stained 5 % acrylamide gel showing polymorphism at locus 1210 (A, *Lcy-b* gene) and 1388 (B, *Hy-b* gene) in 25 *Citrus* genotypes. Numbers represent genotypes described in Table 1. The arrows indicate different fragments (174, 177, 180 and 183 pb for the gel A and 133, 139 and 142 pb for the gel B).

- C. medica*
- *Lcy-b\_5*: E4S1
  - *Lcy-b\_6*: E4S2

An additional allele, E3S3 (*Lcy-b\_7*), was identified for “Mexican” lime.

Differentiation was observed between the basic taxa. The profiles for all secondary species can be reconstructed from these alleles. Deduced genetic structure is given in **Table 5**. Sweet oranges and clementine were heterozygous (*Lcy-b\_1* / *Lcy-b\_3*) with one mandarin and one pummelo allele. Sour oranges were also heterozygous (*Lcy-b\_1* / *Lcy-b\_4*) sharing the same mandarin allele as sweet oranges but with another pummelo allele. Grapefruits were heterozygous (*Lcy-b\_3* / *Lcy-b\_4*) with two pummelo alleles. All the acid secondary species were heterozygous, having one allele from citrons and the other one from mandarins (*Lcy-b\_1*) except for “Mexican” lime which had a specific allele.

**The *Hy-b* gene with RFLP analysis.** Four and two bands were clearly differentiated with *EcoRV* and *BamHI* restriction enzymes respectively. One to two bands were observed for each genotype with each enzyme. This would appear to be coherent with the monolocus pattern of *Hy-b*. However the fact that the three pummelos presented the same two band profiles with the two enzymes make this hypothesis questionable. Indeed the probability of these three genotypes to be heterozygous for the same alleles is rather low and an alternative hypothesis should be that pummelos have two copies of the *Hy-b* gene per haploid genome. It prevented us from proposing a genetic interpretation for the concerned profiles.

The bands were shared as follows:

***EcoRV***

- E1: the two citrons, “Volkamer” and “Meyer” lemons and “Rangpur” lime;
- E2: the three pummelos, the three *C. aurantium* and “Palestine sweet” lime;
- E3: all varieties except citrons;
- E4: “Satsuma” mandarin.

***BamHI***

- B1: all genotypes;
- B2: the three pummelos and the three grapefruits.

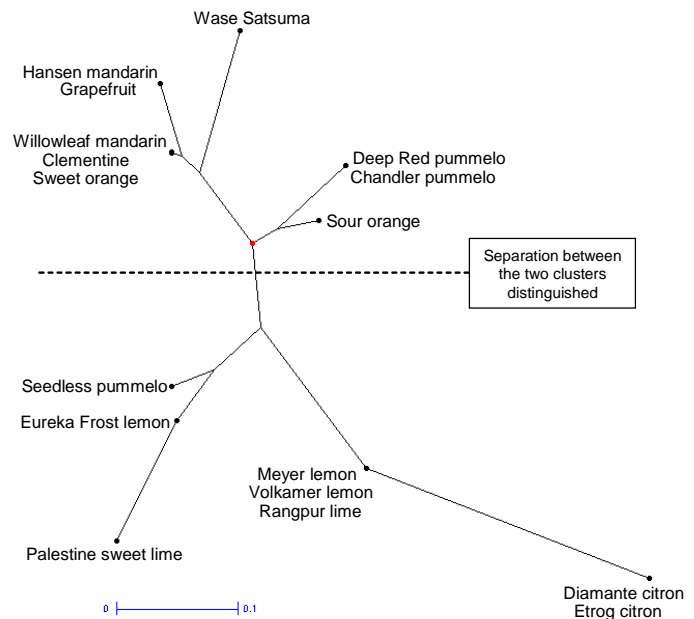
**The *Hy-b* gene with SSR analysis.** Three bands were detected at locus 1388 (*Hy-b* gene) (see **Figure 4**). One or two bands were detected for each variety. This is consistent with the hypothesis of only one locus for this gene. No intra-taxon molecular polymorphism was found within grapefruits, sweet oranges and sour oranges. The three bands were shared as follows:

- S1: “Seedless” pummelo, the two citrons and all acid *Citrus*;
- S2: all *Citrus* except citrons and “Mexican” lime;
- S3: “Mexican” lime

All acid varieties were heterozygous and possessed the citron allele.

It should be noted that with both RFLP and SSR analyses, all fragments were observed in the basic taxon samples except for S3. A global analysis of the relationship using data from Neighbor-Joining analysis of RFLP and SSR data is presented in **Figure 5**. The tree shows a clear separation between mandarin, clementine,

sweet and sour orange, and grapefruit genotypes and acid *Citrus*. “Seedless” pummelo is in the acid *Citrus* cluster because it shares with them the S1 SSR fragment, while other pummelos are closer to the mandarin / orange / grapefruit cluster.



**Figure 5.** Representation of diversity based on RFLP and SSR analysis for the *Hy-b* gene. The tree was constructed according to the Neighbor-Joining method using a Dice matrix of dissimilarity.

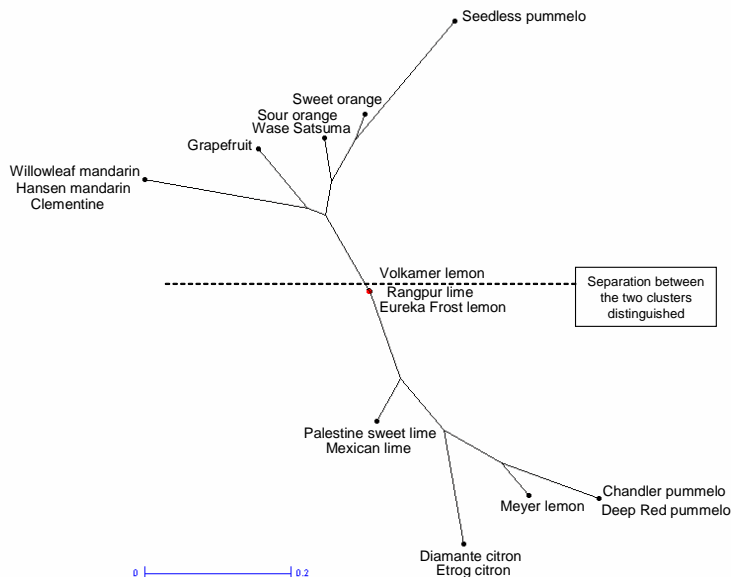
**The *Zep* gene.** Seven fragments were observed with the *EcoRV* restriction enzyme. Ten different profiles were identified among the 25 varieties. No *EcoRV* restriction site was found in the probe sequence. Each variety displayed two to four bands which suggests that this gene is present at two different loci in the *Citrus* genome, and that we revealed polymorphism for the two loci. Among the seven bands the following should be mentioned:

- E3: only found in grapefruits;
- E5: specific to citrons among the basic taxon samples and shared by all acid *Citrus*;
- E6: specific to mandarins among the basic taxon samples and shared in heterozygous status by all grapefruits, sweet oranges and sour oranges as well as clementine and all acid *Citrus* except “Meyer” lemon.

Except for “Seedless” pummelo and “Satsuma” mandarin, all other members of the basic taxa presented only two bands and were probably homozygous at the two loci. Moreover these homozygous individuals did not display intra-taxon diversity. Most of the secondary species were heterozygous for at least one of the loci (three bands or more) except for clementine which was identical to “Willow leaf” mandarin with only two bands. Global genetic relationships for this gene revealed by Neighbor-Joining tree analysis are presented in **Figure 6**. Each of these three secondary species: *C. sinensis*, *C. aurantium* and *C. paradisi* is represented by only one individual. As in the other Neighbor-Joining tree analyses, acid *Citrus* were separate from mandarins, clementine, sweet and sour orange and grapefruit

genotypes. Surprisingly, “Seedless” pummelo was close to orange genotypes while the two other pummelos were in the citron cluster.

**The *Lcy-e* gene.** Five RFLP fragments were observed with *EcoRV* and five with *HindIII* restriction enzymes. With the two restriction enzymes, we identified 11 different profiles. The number of bands per individual



**Figure 6.** Representation of the diversity based on RFLP analysis around the *Zep* gene. The tree was constructed according to the Neighbor-Joining method using a Dice matrix of dissimilarity.

ranged from one to three with *EcoRV* and one to five with *HindIII*. The individuals of two basic taxa, *C. medica* and *C. maxima*, displayed only one band for *EcoRV* and *HindIII*, while the three varieties of *C. reticulata* displayed the same profile with two bands with *EcoRV* and three with *HindIII*. Taking into account (i) the presence of a *HindIII* restriction site in the EST probe sequence, (ii) the observation of three and five bands with *EcoRV* and *HindIII* respectively for secondary species, we proposed the hypothesis that *Lcy-e* is present at only one locus in *C. maxima* and *C. medica* genomes but at two loci in mandarin and other *Citrus* genomes. Due to the complexity and incertitude of genetic interpretation because of the presence of a *HindIII* restriction site in the probe sequence, we limited our genetic interpretation to the profiles observed with *EcoRV*.

Differentiation among the three basic taxa was observed with one specific band for *C. medica* (E1), one very close by for *C. maxima* (E2) and two specific bands for *C. reticulata* (E4 and E5). The two bands of *C. reticulata* obtained with *EcoRV* were also observed in all secondary species that had mandarin as one ancestral parent. In the same way, one of the bands observed in *C. medica* or *C. maxima* was observed in all secondary species with the exception of sweet oranges and clementine, which displayed the same profile as mandarins. “Mexican” lime presented a specific band (E3) and the band of citrons. Under the hypothesis that *Lcy-e* is present in two copies per haploid genome in *C. reticulata* whereas it is present in only one copy in *C. maxima* and *C. medica*, most of the secondary species

should be heterozygous for the common locus (**table 5**). *C. paradisi* and *C. aurantium* presented the allele of mandarins and the allele of pummelos while all acid *Citrus* except “Mexican” lime presented the citron and the mandarin allele. We thus propose that sweet oranges and clementine are homozygous for the mandarin allele. For the second locus of *C. reticulata* we were unable to determine if the secondary species were homozygous or heterozygous (presence/absence).

## DISCUSSION

**The number of gene copies and genetic diversity of the genes involved in the carotenoid biosynthetic pathway.** The number of copies per haploid genome of the seven genes of the carotenoid biosynthetic pathway was deduced from RFLP analyses. It ranged from one for *Lcy-b* to at least three for *Zds*.

**The *Psy* gene.** The observed profiles led us to conclude that *Psy* should be present in two copies in the *Citrus* genome. Two *Psy* genes have also been found in tomato (*lycopersicon esculentum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) (35-37). Conversely, only one *Psy* gene has been found in *Arabidopsis thaliana* and in pepper (*Capsicum annuum*) which also accumulates carotenoids in fruits (38-39). According to Bartley and Scolnik (1993) (35) *Psy1* was expressed in tomato fruit chromoplasts while *Psy2* was specific to leaf tissue. In the same way, in *Poaceae* (maize, rice), Gallagher *et al.* (2004) (37) found that *Psy* gene was duplicated and that *Psy1* and not *Psy2* transcripts in endosperm correlated with endosperm carotenoid accumulation. These results underline the role of gene duplication and the importance of tissue specific phytoene synthase in the regulation of carotenoid accumulation. In our varietal sample and with the restriction enzyme used, we found the first locus to be monomorphic and the second to be polymorphic. The locus appeared to be monomorphic for citrons, and three or five alleles were proposed for mandarins and pummelos respectively. All bands were observed in the three basic taxon samples and, in addition, the proposed allelic interpretation based on the two enzymatic restriction profiles for basic species allows the reconstruction of all profiles in the secondary species.

**The *Pds* gene.** The profiles obtained with *EcoRV* restriction enzyme lead us to believe that the *Pds* gene has two copies in *Citrus* genome. Conversely, studies on *Arabidopsis*, tomato, maize and rice showed that *Pds* was a single copy gene (38, 40-41). However, a previous study on *Citrus* (42) suggests that *Pds* is present as a low-copy gene family in the *Citrus* genome, which is in agreement with our findings. In *Citrus*, we found monomorphic RFLP profiles for one locus with *EcoRV*. Five alleles were identified for the other locus. The three basic taxa were differentiated with no intra-taxon diversity in our samples. Two rare alleles were identified; one for “Volkamer” lemon and one for “Mexican” lime.

**The *Zds* gene.** RFLP analyses with *EcoRV* and *BamHI* suggest at least three loci for the *Zds* gene. In *Arabidopsis*, maize and rice, like *Pds*, *Zds* was a single-copy gene (38, 41). We found no previous data on the number of copies of the *Zds* gene in the *Citrus* genome. Some bands differentiated the three basic taxa but the multilocus status of this gene did not enable genetic



interpretation. Two fragments were not observed in our samples of basic taxa; one rare fragment only found in “Rangpur” lime and the other one common to *C. aurantium*, “Volkamer” lemon and “Palestine sweet” lime. This suggests a common ancestor between the latter genotypes in agreement with the assumption of Nicolosi *et al* (2000) (26) that “Volkamer” lemon results from a complex hybrid combination with *C. aurantium* as one parent. It will be necessary to extend the analysis of the basic taxa to see if these specific bands are present in the germplasm of these taxa or result from mutations after the formation of the secondary species.

**The *Lcy-b* gene.** RFLP and SSR analyses suggested that *Lcy-b* is present as a single copy in each haploid *Citrus* genome. Two lycopene  $\beta$ -cyclases encoded by two genes have been identified in tomato (43). The B gene encoded a novel type of lycopene  $\beta$ -cyclase whose sequence was similar to capsanthin-capsorubin synthase. B expressed at a high level in Beta mutants was responsible for strong accumulation of  $\beta$ -carotene in fruits, while in wild-type tomatoes, B was expressed at a low level. Combining RFLP and SSR data, we identified four alleles that differentiated the three basic taxa. An additional allele was observed for “Mexican” lime.

**The *Hy-b* gene.** RFLP profiles suggest a monolocus status. However, with this hypothesis the three pummelos would be heterozygous with the same profiles for *EcoRV* and *BamHI*. Considering the low probability of such results, we refrained from proposing a genetic interpretation for *Hy-b*. Moreover, two *Hy-b* genes were found in *Arabidopsis thaliana* genome and in tomato (38, 44) while the Southern blot pattern obtained from “Satsuma” mandarin (15) with three restriction enzymes showed one to three bands, which is more consistent with the hypothesis of one locus. Additional analyses with additional restriction enzymes and the study of haploid genotypes of the three basic taxa will probably enable us to determine the number of loci of *Hy-b* in the *Citrus* genome. All bands were observed in the basic taxon samples. At the level of the basic taxa, we observed one band specific to *C. maxima* and one to *C. medica* with *EcoRV* and one specific to *C. maxima* with *BamHI*.

**The *Zep* gene.** The observed RFLP profiles are in agreement with the existence of two polymorphic loci for this gene. Only one copy of the *Zep* gene was found in *Arabidopsis* genome (38, 45). No previous data were available on the number of copies of *Zep* in *Citrus* genome. All bands except one were observed in the basic taxon samples. Genotypes of these taxa are probably mostly homozygous while partial or total heterozygosity was found in secondary species.

**The *Lcy-e* gene.** The *EcoRV* and *HindIII* profiles observed lead us to propose that the gene is present as a double copy in the haploid *C. reticulata* genome whereas only one copy is present in *C. maxima* and *C. medica*. Under this hypothesis, from the genetic interpretation based on *EcoRV* restriction, we conclude that the allelic differentiation between the three basic taxa is complete for the common locus. Only one additional fragment was observed for “Mexican” lime. All secondary species are heterozygous for this locus except sweet oranges and clementine which are homozygous for the mandarin allele. The results of Ronen *et al.* (1999) (46) on tomato suggest that *Lcy-e* is a single-copy gene and that the *Del* mutation is an allele of *Lcy-e*. The tomato Delta mutants

were orange, and accumulated  $\delta$ -carotene at the expense of lycopene. The Delta mutation changed the mRNA level of the *Lcy-e* gene during fruit development.

**Agreement with the hypothesis concerning the evolution of cultivated *Citrus*.** The organisation of genetic diversity based on the RFLP profiles obtained with seven genes of the carotenoid pathway was very similar to that previously obtained with neutral molecular markers such as genomic SSR (47). Moreover, in our study, most of the fragments observed with RFLP (50/58) and all SSR fragments were observed in the limited samples of the three basic taxa (8 genotypes). A strong differentiation between the three basic taxa was also observed with numerous bands (or alleles in the case of genetic interpretation) specific to one of these taxa. The mean number of RFLP bands per individual was lower for basic taxa than for the group of secondary species. This result indicates that secondary species are much more heterozygous than the basic ones for these genes, which is logical if we assume that the secondary species arise from hybridizations between the three basic taxa. Moreover *C. medica* appears to be the least heterozygous taxon for RFLP around the genes of the carotenoid biosynthetic pathway, as already shown with isozymes (25), RFLP (26) and SSR (47) markers. All these results suggest that the observed RFLP and SSR fragments are good phylogenetic markers; in other words that the observation of the same band in basic taxa and secondary species can be interpreted as the inheritance of this fragment from the basic taxa by the secondary taxa.

For the genes for which we were able to propose a genetic interpretation, we reconstructed the observed profiles of secondary species from the alleles proposed for the three basic taxa. The proposed genotypes are in full agreement with the hypothesis on the origin of these secondary species (25-26). We illustrate this assumption for six major commercial *Citrus* species:

Sweet oranges and sour oranges were assumed to be complex hybrids between mandarins and pummelos, probably backcrossed with the mandarin gene pool (25). For *Psy* and *Lcy-b* genes, they presented heterozygotic profiles sharing the same mandarin allele and two different pummelo alleles. For *Pds*, sweet and sour oranges shared the same heterozygotic profile with one mandarin and one pummelo allele. For *Lcy-e* analysed after *EcoRV* restriction, we concluded that sweet oranges had two mandarin alleles, while sour oranges were heterozygous with one pummelo and one mandarin allele. For all other genes, we found a differentiation between sweet and sour oranges. Sweet oranges were generally closer to mandarins than to sour oranges. Only one band from sour oranges for the *Pds* gene and one from sweet oranges and sour oranges for *Lcy-e* (*HindIII*) were not observed in mandarin or pummelo samples. Since these two last species are polymorphic and we do not know the real parents of sweet and sour oranges, it is probable that a wider study of basic taxon germplasm will enable identification of these fragments.

Clementine was assumed to be a hybrid between “Willow leaf” mandarin and a sweet orange (26). We found the following organisation for the carotenoid biosynthetic genes: clementine was heterozygous for the *Psy* gene with two mandarin alleles, one shared with sweet oranges and one specific to “Willow leaf” mandarin. It was heterozygous for *Pds* and *Lcy-b* with,

for each gene, one allele of pummelo (shared with sweet oranges) and one allele of mandarin. Moreover clementine presented the same profiles as “Willow leaf” mandarin for *Hy-b* and *Zep* genes. Its profile was identical to sweet oranges for *Lcy-e* and we thus concluded that they share two alleles from *C. reticulata* for the locus common to all taxa.

Grapefruits were assumed to be hybrids between pummelos and sweet oranges which originated in the Caribbean after the introduction of *Citrus* in the New World by Christopher Columbus (25-26). For the *Psy* gene, *C. paradisi* was heterozygous and displayed an identical profile to sweet oranges with one pummelo and one mandarin allele. For *Pds* and *Lcy-b*, *C. paradisi* displayed only pummelo alleles with a homozygous status for *Pds* and heterozygous for *Lcy-b*. The pummelo alleles found in sweet oranges were present in the two genes. For *Lcy-e*, from the *EcoRV* analysis we concluded that grapefruits were heterozygous with one mandarin and one pummelo allele. Moreover grapefruits shared the *HindIII* restriction bands of sweet oranges not observed in the limited basic taxon samples. A RFLP fragment specific to *C. paradisi* was observed for the *Zep* gene with *EcoRV*. As sweet oranges appeared to be totally monomorphic for the molecular markers analyzed, it can be assumed that this grapefruit *Zep* fragment was inherited from its pummelo parent. Wider analysis of pummelo germplasm and particularly of Caribbean germplasm should enable confirmation of this hypothesis.

Nicolosi *et al.* (2000) (26) proposed that lemons arose from hybridization between sour oranges and citrons. For *Psy* we found that “Eureka” lemon was heterozygous with one allele of citron, and one of pummelo also found in sour oranges. For *Pds*, *Lcy-b* and *Lcy-e*, “Eureka” lemon was heterozygous with one allele of mandarin - also observed in sour oranges- and one citron allele.

“Mexican” lime was assumed to be a hybrid between *C. medica* and *C. micrantha* (26). For all genes of the carotenoid biosynthetic pathway, we found that ‘Mexican’ lime had one allele or specific bands from citrons, confirming the direct parentage of citrons. Moreover, among the eight out of 58 fragments not observed in the three basic taxa, three were specific to “Mexican” lime, as was one SSR band for *Hy-b*. It can be assumed that these four rare alleles of Mexican lime come from *C. micrantha*.

**Relation between the phylogenic origin of alleles and carotenoid content.** From analysis of carotenoid contents, we previously proposed (23) that modification of four major steps of the biosynthetic pathway can explain the qualitative phenotypic differentiation among *Citrus* species. The variability of these steps is probably due to a modification in the specific activity of the key enzymes (supported by allelic variability of the corresponding genes) or by modifications in gene expression. By analyzing the relation between phenotypic variability (23) and the organization of genetic diversity of the key genes observed in the same genotype samples, we propose the hypothesis that phenotypic variability is linked to allelic diversity of the key gene for the four steps concerned.

We proposed (23) that the formation of phytoene from geranylgeranyl diphosphate catalysed by phytoene

synthase is a key step in the differentiation of citrons and several acid lemons such as “Palestine sweet” lime, “Eureka” and “Meyer” lemons from the other *Citrus*. In the present study we found that for the polymorphic *Psy* locus, both acid *Citrus* producing very low levels of carotenoids (citrons, lemons) and those with higher carotenoid contents (“Rangpur” lime, “Volkamer” lemon) were homozygous for the citron alleles. It is thus clear that the phenotypic differentiation cannot be attributed to the allelic variability observed among the basic taxa for *Psy* locus. The carotenoid composition of acid *Citrus* may be due to the level of expression of carotenoid biosynthetic genes. Kato *et al.* (2004) (19) showed that the level of expression of genes that produced  $\beta,\beta$ -xanthophylls was lower in juice sacs of “Lisbon” lemon than in juice sacs of “Satsuma” mandarin. The genes responsible for carotenoid catabolism were also shown to be involved. According to Kato *et al.* (2006) (29), the expression level of carotenoid cleavage dioxygenase genes (*CitNCED* genes) which are involved in the cleavage of  $\beta,\beta$ -xanthophylls and abscissic acid synthesis, controlled the accumulation of 9-*cis*-violaxanthin in juice sacs of “Lisbon” lemon, “Satsuma” mandarin and “Valencia” orange. Moreover the expression level of genes of the methylerythritol phosphate pathway may play an important role as is the case in tomato fruit. Indeed, studies on tomato showed that carotenoid contents were controlled by the coordinated expression of *Dxs* and *Psy* genes (9). Regulations at the transcriptional level appear to play a major role in acid *Citrus*.

A second key step is the cyclisation of lycopene catalyzed by the lycopene  $\beta$ -cyclase (*LCY-b*). We proposed (23), that this step is involved in the differentiation of pummelos and grapefruits from other *Citrus*. Pummelos and grapefruits produced  $\beta$ -carotene but accumulated mainly lycopene. Our results showed that *Lcy-b* was a single-copy gene and that only grapefruits had two pummelo alleles for this gene, while other secondary species presented one allele from mandarin and one allele from pummelo or from citron. This suggests that the carotenoid composition of pummelos and grapefruits is due to pummelo alleles for the *Lcy-b* gene. The pummelo allele might be involved in down-regulation of the activity of *LCY-b* occurring at either the transcriptional or post-transcriptional level.

The two other key steps are catalyzed by  $\beta$ -carotene hydroxylase (*HY-b*) and zeaxanthin epoxidase (*ZEP*) which convert  $\beta$ -carotene into violaxanthin. According to results of our previous study (23), mandarins, sweet and sour oranges and clementine were characterized by the presence of both  $\beta$ -cryptoxanthin and violaxanthin in juice sacs. “Rangpur” lime and “Volkamer” lemon, which are hybrids between citrons and mandarins and citrons and sour oranges -probably back-crossed with mandarins- (26), also produced  $\beta$ -cryptoxanthin and violaxanthin though in smaller amounts. The Neighbor-joining tree obtained from RFLP around the *Hy-b* gene and SSR analysis showed that “Deep Red” pummelo and all grapefruits that did not produce  $\beta$ -cryptoxanthin but did produce  $\beta$ -carotene and accumulated lycopene were grouped in the mandarin / orange cluster. This provides some evidence that the diversity in carotenoid composition at the interspecific level is not linked to the allelic diversity observed for the *Hy-b* gene. The level of expression of this gene in the juice sacs of pummelos and grapefruits may play a role. However, no study has yet

been conducted on the expression of carotenoid biosynthetic genes in juice sacs of pummelo or grapefruit fruits. In the same way, the Neighbor-joining tree based on RFLP around the *Zep* gene showed that grapefruits were clustered with mandarins, sweet and sour oranges and that “Eureka” lemon was close to “Volkamer” lemon and “Rangpur” lime. These results suggest that carotenoid composition is not linked to the allelic diversity observed for the *Zep* gene.

Previous studies on carotenoid composition of *Citrus* juices indicated that only mandarins, clementines and sweet oranges accumulated  $\alpha$ -carotene, zeinoxanthin and lutein (18, 20-24). The genetic interpretation of *Lcy-e* RFLP profiles leads us to propose that *Lcy-e* is present in one copy in *C. maxima* and *C. medica* and in two copies in *C. reticulata* and secondary species. Under this hypothesis, only mandarins, sweet oranges and clementine were homozygous for the mandarin allele at the common locus, suggesting that allelic variability plays a role in the synthesis of  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ , $\epsilon$ -xanthophylls.

## ABBREVIATIONS USED

GGPP, geranylgeranyl diphosphate. HY-b,  $\beta$ -carotene hydroxylase. HY-e,  $\epsilon$ -carotene hydroxylase. LCY-b, lycopene  $\beta$ -cyclase. LCY-e, lycopene  $\epsilon$ -cyclase. MEP pathway, methylerythritol phosphate pathway. PDS, phytoene desaturase. PSY, phytoene synthase. RFLP, restriction fragment length polymorphism. SSR, simple sequence repeats. ZDS,  $\zeta$ -carotene desaturase. ZEP, zeaxanthin epoxidase.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the *Collectivité Territoriale de Corse* for granting this study. We thank C. Jacquemond and F. Curk (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for their assistance and for helpful discussions.

## LITERATURE CITED

- (1) Demming-Adams, B.; Gilmore, A. M.; Adams, W. W. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB. J.* **1996**, *10*, 403-412.
- (2) Huh, J. H.; Kang, B. C.; Nahm, S. H.; Kim, S.; Ha, K. S.; Lee, M. H.; Kim, B. D. A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *102* (4), 524-530.
- (3) Olsen, J. A. Provitamin A function of carotenoid. The conversion of beta-carotene into vitamin A. *J. Nutr.* **1989**, *119*, 105-108.
- (4) Krinsky, N. Y. Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **1993**, *13*, 561-587.
- (5) Mayne S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* **2003**, *133* (3S), 933-940.
- (6) Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 210-218.
- (7) Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *385*, 4-12.
- (8) Lichtenthaler, H. K. The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 47-65.
- (9) Rodriguez-concepcion, M.; Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1079-1089.
- (10) Fraser, P. D.; Bramley, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 228-265.
- (11) Isaacson, T.; Ronen, G.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell.* **2002**, *14*, 333-342.
- (12) Park, H.; Kreunen, S. S.; Cutriss, A. J.; DellaPenna, D.; Pogson, B. J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, promellar body formation and photomorphogenesis. *Plant Cell.* **2002**, *14*, 321-332.
- (13) Cunningham, F. X.; Pogson, B.; Sun, Z.; McDonald, K.A.; DellaPenna, D.; Gantt, E. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell.* **1996**, *8*, 1613-1626.
- (14) Inoue, K.; Furbee, K. J.; Uratsu, S.; Kato, M.; Dandekar, A. M.; Ikoma, Y. Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. *Physiol. Plant.* **2006**, *127* (4), 561-570.
- (15) Kim, I.-J.; Ko, K.-C.; Kim, C.-S.; Chung, W.-I. Isolation and characterization of cDNA encoding  $\beta$ -carotene hydroxylase in Citrus. *Plant Sci.* **2001**, *161*, 1005-1010.
- (16) Gross, J. Pigments in fruits; Harcourt Brace Javanovich: London, U. K., 1987.
- (17) Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; Lapierre, L.; Corsetti, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4038-4045.
- (18) Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M.-J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2140-2145.
- (19) Kato, M.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Sugiura, M.; Hyodo, H.; Yano, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1-14.
- (20) Goodner, K. L.; Rouseff, R. L.; Hofsommer, H. J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1146-1150.
- (21) Lee, H. S.; Coates, G. A. Characterization of color fade during frozen storage of red grapefruit juice

- concentrates. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3988-3991.
- (22) Xu, C.-J.; Fraser, P. D.; Wang, W.-J.; Bramley, P. M. Differences in the carotenoid content of ordinary Citrus and lycopene-accumulating mutants. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5474-5481.
- (23) Fanciullino, A. L.; Dhuique-Mayer, C.; Luro, F.; Casanova, J.; Morillon, R.; Ollitrault, P. Carotenoid diversity in cultivated Citrus is highly influenced by genetic factors. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4397-4406.
- (24) Lee, H. S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2563-2568.
- (25) Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Luro, F.; Cottin, R. La diversité des agrumes: structuration et exploitation par hybridation somatique. *C. R. Acad. Agric.* **2000**, *86*, 197-221.
- (26) Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; LaMalfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *100*, 1155-1166.
- (27) Barret, H. C.; Rhodes, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* **1976**, *1*, 105-136.
- (28) Barkley, N. A.; Roose, M. L.; Krueger, R. R.; Federici, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* **2006**, *112* (8), 1519-1531.
- (29) Kato, M.; Matsumoto, H.; Ikoma, Y.; Okuda, H.; Yano, M. The role of carotenoid cleavage dioxygenase in the regulation of carotenoid profiles during maturation in Citrus fruit. *J. Experimental Bot.* **2006**, *57*, 2153-2164.
- (30) Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin* **1987**, *19*, 11-15.
- (31) Manning, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.* **1991**, *195*, 45-50.
- (32) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- (33) Terol, J.; Conesa, A.; Colmenero, J. M.; Cercos, M.; Tadeo, F.; Agustí, J.; Alos, E.; Andres, F.; Soler, G.; Brumos, J.; Iglesias, D. J.; Götz, S.; Legaz, F.; Argout, X.; Courtois, B.; Ollitrault, P.; Dossat, C.; Wincker, P.; Morillon, R.; Talon, M. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics.* **2007**, *25*, 8-31.
- (34) Beidler, J. L.; Hilliard, P. R.; Rill, R. L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 374-380.
- (35) Bartley, G. E.; Scolnik, P. A. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (34), 25718-25721.
- (36) Busch, M.; Seuter, A.; Hain, R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* **2002**, *128* (2), 439-453.
- (37) Gallagher, C. E.; Matthews, P. D.; Li, F. Q.; Wurtzel, E. T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiol.* **2004**, *135* (3), 1776-1783.
- (38) Lange, B. M.; Ghassemian, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol. Biol.* **2003**, *51*, 925-948.
- (39) Romer, S.; Hugueney, P.; Bouvier, F.; Camara, B.; Kuntz, M. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *196* (3), 1414-1421.
- (40) Corona, V.; Aracri, B.; Kosturkova, G.; Bartley, G. E.; Pitto, L.; Giorgetti, L.; Scolnik, P. A.; Giuliano, G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J.* **1996**, *9* (4), 505-512.
- (41) Matthews, P. D.; Luo, R. B.; Wurtzel, E. T. Maize phytoene desaturase and zeta -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* **2003**, *54* (391), 2215-2230.
- (42) Kita, M.; Komatsu, A.; Omura, M.; Yano, M.; Ikoma, Y.; Moriguchi, T. Cloning and expression of CitPDS1, a gene encoding phytoene desaturase in Citrus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 1424-1428.
- (43) Ronen, G.; Carmel-Goren, L.; Zamir, D.; Hirschberg, J. An alternative pathway to beta -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, *97* (20), 11102-11107.
- (44) Galpaz, N.; Ronen, G.; Khalfa, Z.; Zamir, D.; Hirschberg, J. A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell.* **2006**, *18* (8), 1947-1960.
- (45) Xiong, L.; Lee, H.; Ishitani, M.; Zhu, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (10), 8588-8596.
- (46) Ronen, G.; Cohen, M.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J.* **1999**, *17*, 341-351.
- (47) Luro, F.; Rist, D.; Ollitrault, P. Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. *Acta Horticulturae.* **2001**, *546*, 237-242.

### **III.2.2.Diversité allélique du gène *Lcy-b***

#### **III.2.2.1.Introduction**

La diversité observée avec les analyses RFLP nous a conduit à proposer des hypothèses sur l'origine phylogénétique des fragments d'ADN porteurs des gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes chez les espèces secondaires. Nous ne savons pas, en revanche, si à cette diversité d'origine phylogénétique est associée une variabilité de séquence des gènes eux-mêmes. Les analyses RFLP ont par ailleurs démontré que le gène *Lcy-b* est présent en une seule copie par génome haploïde chez les agrumes. La diversité allélique de ce gène pourrait de plus être associée à la différenciation des pamplemoussiers/pomelos des autres agrumes à cette étape de la chaîne de biosynthèse. Ce gène constitue un bon modèle pour : (1) évaluer dans quelle mesure la structuration du polymorphisme RFLP est un bon indicateur de la variabilité de séquence des gènes correspondants ; (2) vérifier les structures alléliques des espèces secondaires inférées par les données RFLP ; (3) analyser les implications d'une variabilité de séquence nucléotidique sur la séquence protéique et éventuellement sur sa régulation d'expression ou son activité enzymatique.

Dans ce chapitre, la variabilité de la séquence codante de ce gène au sein de notre collection de référence est analysée par DHPLC (OEFNER et UNDERHILL, 1998) sur quatre amplicons obtenus par PCR avec les amorces indiquées dans le Tableau 6. Ces mêmes amplicons sont par ailleurs séquencés pour un représentant de chacun des trois taxons de base tandis que le gène est cloné et séquencé pour l'oranger Cara Cara.

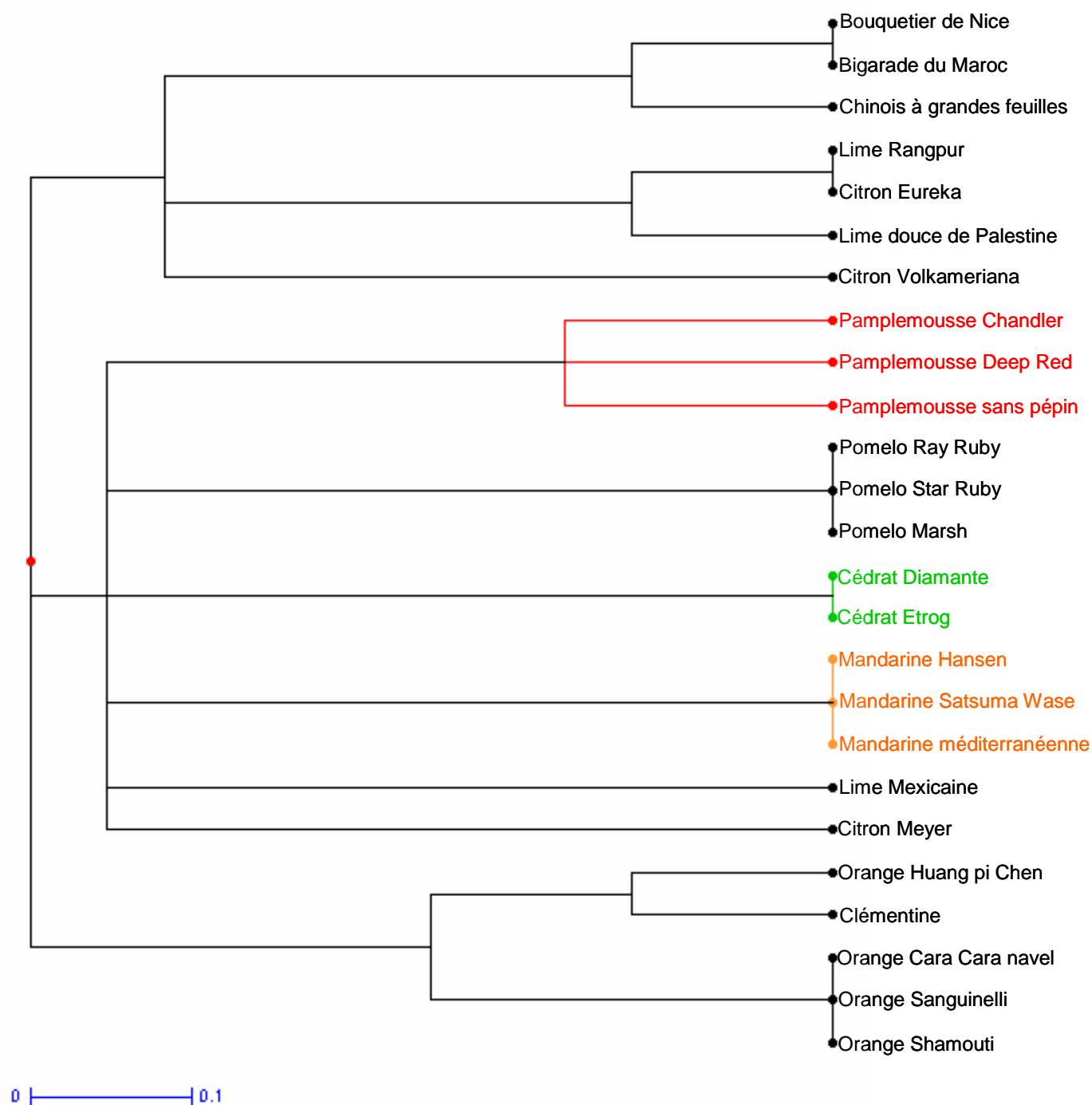
#### **III.2.2.2. Résultats et discussion**

##### **III.2.2.2.1. Analyse de la diversité du gène *Lcy-b* par DHPLC**

Les amplicons ont été analysés par DHPLC à trois températures, 57, 58 et 60°C afin de révéler du polymorphisme sur différents points de mutation potentiels. Le polymorphisme mis en évidence est important avec respectivement 13, 10, 15 et 6 profils différents identifiés pour les amplicons 1, 2, 3 et 4.

Lors des analyses DHPLC, l'ADN de chaque individu est dénaturé puis, on laisse les brins se réappairier entre eux. S'il existe une hétérozygotie, trois types de réappariements sont possibles : des homoduplex de l'allèle 1, des homoduplex de l'allèle 2 et des hétéroduplex (appariements entre deux brins légèrement différents).

La séparation de ces molécules se fait sur une colonne de chromatographie en conditions dénaturantes. Les brins vont donc être relargués de la colonne d'autant plus vite qu'ils sont moins stables. Ainsi, les hétéroduplex sont libérés les premiers (le mauvais appariement entraîne une instabilité), puis les homoduplex de l'allèle le plus riches en TA (la liaison T-A ne possède que deux ponts Hydrogène) et enfin les homoduplex de l'allèle le plus riche en GC (la liaison C-G possède trois ponts Hydrogène). A chaque libération, on obtient un pic sur la courbe finale. Les profils observés ne permettant pas une interprétation allélique directe, nous avons traité ces données de manière qualitative en considérant que chaque profil constituait une modalité particulière de la variable « amplicon » correspondante. A partir de cette matrice individus/amplicons, nous avons réalisé une classification hiérarchique ascendante en utilisant l'indice de dissimilarité de Sokal et Michener (Figure 20). Il apparaît clairement que le polymorphisme intraspécifique est faible. Les trois mandarines sont identiques, ainsi que les deux cédrats. Les pamplemousses apparaissent polymorphes au niveau des amplicons 1 et 3. Aucun polymorphisme intraspécifique n'est mis en évidence entre trois des oranges analysées (cultivars Shamouti, Sanguinelli et Cara Cara navel) ni entre les pomelos. Au sein de l'espèce *C. aurantium*, seul le Chinois à grandes feuilles se différencie pour un amplicon. Par ailleurs, les trois taxons de bases apparaissent fortement différenciés. Ils présentent en effet des profils différents pour les quatre amplicons.



**Figure 20.** Classification des 25 génotypes étudiés sur la base de la diversité de séquence du gène *Lcy-b* analysée par DHPLC. Les trois taxons de base apparaissent fortement différenciés, ils sont représentés par des couleurs différentes sur la figure.

Ainsi l'analyse de la diversité de séquence du gène *Lcy-b* par DHPLC confirme nos conclusions de l'étude RFLP : (1) diversité intraspécifique modérée et (2) différenciation interspécifique importante entre les taxons de base.

Compte tenu du principe même de l'analyse DHPLC, qui porte sur des doubles brins obtenus après dénaturation/renaturation, et de la manière globale dont nous avons traité les résultats, il n'est pas possible d'interpréter les résultats de proximité pour des individus d'origine hybride interspécifique ; en effet ceux-ci forment des hétéroduplex pour les sites différenciant les espèces parentales et présentent donc des profils spécifiques. Ils paraissent donc aussi éloignés de chacun des parents que les parents le sont l'un de l'autre. Afin d'analyser l'apparentement entre espèces secondaires et taxons de base, il convient de travailler avec des outils permettant une lecture allélique des structures hétérozygotes. Nous avons abordé cette étude par séquençage des fragments de ce gène.

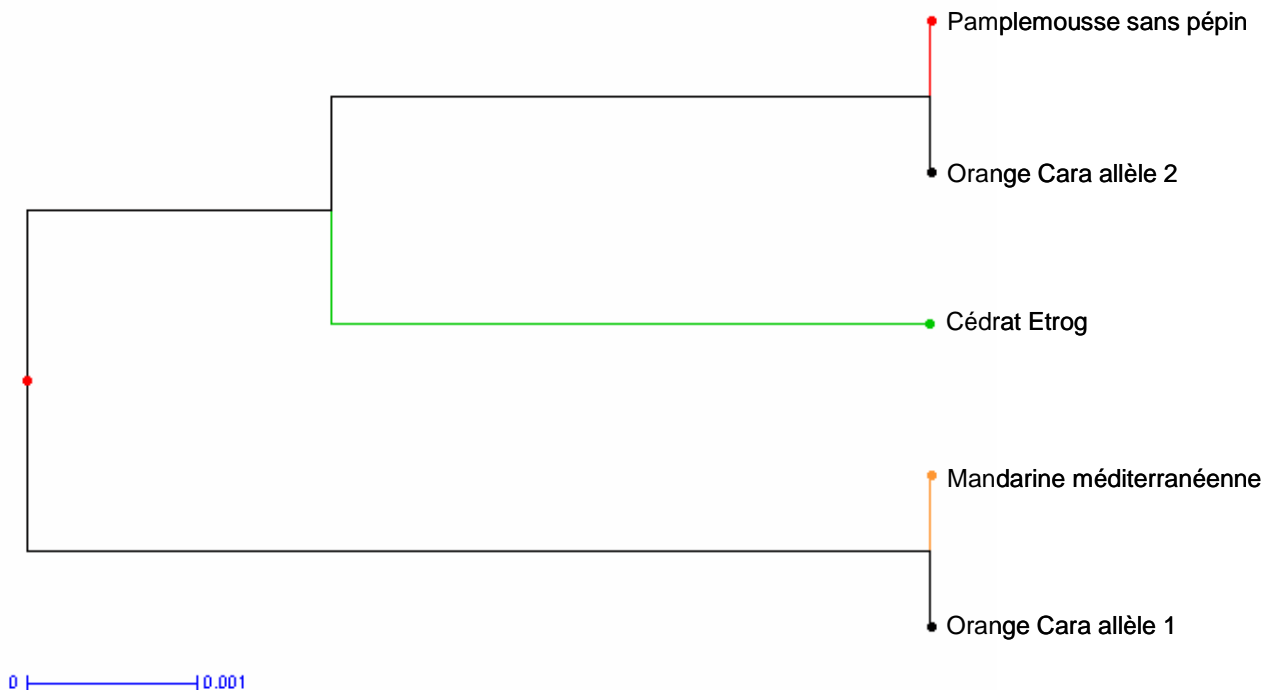
#### III.2.2.2.2 Variabilité de séquence entre les taxons de base et structure allélique de l'oranger

Compte tenu de la différenciation observée par DHPLC entre les taxons de bases, et afin de vérifier l'hypothèse formulée sur la base des RFLPs d'une structure hétérozygote des orangers pour le gène *Lcy-b* avec un allèle de type pamplemousse et un allèle de type mandarine, nous avons étudié la séquence du gène pour les 3 taxons de base et pour l'oranger.

Afin d'obtenir la séquence des deux allèles pour l'oranger supposé hétérozygote, le gène a été cloné et 5 clones séquencés (voir partie III.3.2.). Par ailleurs les taxons de base étant peu polymorphes et donc probablement peu hétérozygotes, nous avons procédé à un séquençage direct des produits PCR. Les quatre amplicons précédemment analysés par DHPLC du pamplemousse sans pépin, du mandarinier méditerranéen et du cédratier Etrog ont ainsi été séquencés. Les portions de séquence exploitables pour l'ensemble des individus sont les suivantes : 29 à 401, 409 à 837, 857 à 1231 et 1275 à 1514 (en nombre de bases après l'atg). Les résultats de séquence confirment nos hypothèses concernant l'homozygotie des taxons de base : seul le pamplemoussier sans pépin présente de l'hétérozygotie limitée à deux bases. Le mandarinier et le cédratier sont totalement homozygotes. Le mandarinier et le pamplemoussier diffèrent par 14 bases, le mandarinier et le cédratier par 16 bases et le



pamplemoussier et le cédratier par 10 bases. L'oranger Cara Cara présente deux allèles différenciés par 14 points de mutation. Afin d'étudier l'apparentement entre les allèles de l'oranger et ceux des taxons de base, nous avons réalisé une classification hiérarchique avec l'indice de Kimura (figure 21). Il apparaît que l'un des allèles est identique à celui du mandarinier et l'autre à celui du pamplemoussier (aux deux points d'hétérozygotie près).



**Figure 21.** Classification obtenue sur la base des séquences du gène *Lcy-b* isolées chez les trois taxons de base et chez l'orange Cara Cara en utilisant une classification hiérarchique ascendante et l'indice de Kimura.

Les analyses de diversité allélique réalisées pour le gène *Lcy-b* sont en accord avec les hypothèses formulées sur la base des données RFLP. L'étude DHPLC mériterait d'être étendue à un échantillon plus large pour les taxons de base ; en particulier pour les pamplemoussiers qui présentent du polymorphisme. L'ensemble des allèles identifiés au sein des taxons de base pourrait ensuite être séquencé afin d'identifier les points de différenciation interspécifiques. Ces régions polymorphes pourraient ensuite être sélectionnées pour un séquençage systématique après clonage chez les espèces secondaires afin de confirmer leur

structure allélique. Le développement de marqueurs de SNP est également envisagé à cet effet.

**III.2.3. Rôle du niveau d'expression de sept gènes de biosynthèse dans la diversité des compositions en caroténoïdes au niveau interspécifique, exemple de *C. sinensis*, *C. limon* et *C. maxima***

**III.2.3.1. Introduction**

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est connue ; elle a été détaillée par plusieurs auteurs (CUNNINGHAM et GANTT, 1998 ; HIRSCHBERG, 2001 ; FRASER et BRAMLEY, 2004). Les gènes de biosynthèse ont été isolés et séquencés chez différentes espèces dont les *Citrus*, *Lycopersicon esculentum*, et *capsicum annum*, espèces qui accumulent des caroténoïdes dans les chromoplastes des fruits (BARTLEY et SCOLNIK, 1993 ; FRASER *et al.*, 1994 ; HUGUENEY *et al.*, 1995 ; BOUVIER *et al.*, 1996 ; RONEN *et al.*, 1999 ; RONEN *et al.*, 2000 ; BOUVIER *et al.*, 1998b ; IKOMA *et al.*, 2001 ; KIM *et al.*, 2001 ; KITA *et al.*, 2001 ; ISAACSON *et al.*, 2002 ; KATO *et al.*, 2004 ; RODRIGO *et al.*, 2004). Cependant, les mécanismes de régulation de la biosynthèse des caroténoïdes et de leur accumulation dans les chromoplastes des fruits ne sont pas encore élucidés.

Les études conduites concernant la tomate et le poivron ont montré que l'expression des gènes de biosynthèse joue un rôle important dans l'accumulation des caroténoïdes dans les chromoplastes des fruits (ROMER *et al.*, 1993 ; FRASER *et al.* 2002). De plus, certains phénotypes particuliers chez la tomate (mutant *Beta*, mutant *Delta*, affectés dans la pigmentation) peuvent être expliqués par des variations de l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes (RONEN *et al.*, 1999 ; RONEN *et al.*, 2000). Les variations des quantités de transcrits peuvent être dues à la présence d'une variation sur un des allèles au niveau de la séquence promotrice comme dans le cas du gène *Del* codant pour une lycopène  $\epsilon$ -cyclase chez le mutant *Delta* de la tomate (RONEN *et al.*, 1999). Les agrumes présentent des compositions complexes en caroténoïdes dans la peau et la pulpe des fruits. Des corrélations entre les compositions en caroténoïdes de la peau ou de la pulpe des agrumes et les profils d'expression de certains gènes de biosynthèse ont été mises en évidence (IKOMA *et al.*, 2001 ; KITA *et al.*, 2001 ; RODRIGO *et al.*, 2004). Cependant, ces études ne permettent pas d'expliquer les différences inter et intraspécifiques. Seuls KATO *et al.* (2004) ont analysé l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans la synthèse des  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylles afin de déterminer le rôle de la régulation au niveau transcriptionnel dans l'accumulation différentielle des caroténoïdes dans les sacs à jus de trois espèces d'agrumes. Cependant, cette étude ne comporte pas de variété de pamplemousse (*C. maxima*) ou de

pomelo (*C. paradisi*). De plus, les différences entre l'orange Valencia (*C. sinensis*) et le citron de Lisbonne (*C. limon*) ne semblent pas expliquées par des variations d'expression des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Crtiso*, *Lcy-b*, *Hy-b*, et *Zep*.

Précédemment, nous avons montré que les espèces du genre *Citrus* se répartissaient en trois groupes selon les compositions en caroténoïdes et que cette structuration était en accord avec la diversité génétique des agrumes. Ainsi, les mandarines, oranges, bigarades et clémentines sont caractérisées par l'accumulation de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la violaxanthine dans les sacs à jus des fruits. Les cédrats et les agrumes acides présentent de faibles teneurs en caroténoïdes et sont caractérisés par l'absence de la violaxanthine. Les variétés du groupe des pamplemousses et pomelos se distinguent des variétés des deux autres groupes par de faibles teneurs globales en caroténoïdes avec une accumulation préférentielle de carotènes et l'absence de la  $\beta$ -cryptoxanthine. Nous avons distingué cinq étapes importantes de la biosynthèse des caroténoïdes qui paraissent impliquées dans la diversité des compositions en caroténoïdes des agrumes. Le polymorphisme dans les séquences des gènes contrôlant ces étapes chez les agrumes est le premier mécanisme de régulation que nous avons étudié. Le phénotype des pamplemousses et des pomelos semble lié à la présence d'un allèle spécifique pour le gène *Lcy-b*. Ce polymorphisme au niveau du gène *Lcy-b* peut se traduire par la formation d'une enzyme non fonctionnelle ou par une variation de l'expression de ce gène. De même l'accumulation de lutéine et des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles serait liée à un allèle spécifique du gène *Lcy-e* chez les mandarines, oranges et clémentines. En revanche, le polymorphisme révélé dans ou autour de la séquence du gène *Psy* ne permet pas d'expliquer le phénotype des agrumes acides. Enfin, pour les gènes *Hy-b* et *Zep*, le polymorphisme mis en évidence n'est pas lié à la diversité des compositions en  $\beta,\beta$ -xanthophylles dans les jus d'agrumes.

L'objectif de cette étude est de déterminer le rôle de l'expression des gènes de biosynthèse dans la diversité des compositions en caroténoïdes au niveau interspécifique. Cette étude permet de compléter les analyses sur le polymorphisme des séquences des gènes de biosynthèse et de répondre aux questions suivantes : (a) la diversité des compositions en caroténoïdes pour des espèces appartenant à chacun des trois groupes précédemment distingués est-elle liée à l'expression des gènes de biosynthèse ? (b) Le polymorphisme pour le gène *Lcy-b* a-t-il pour conséquence une variation dans l'expression de ce gène chez le pamplemousse ? (c) Le phénotype des agrumes acides est-il lié à l'expression du gène *Psy*

contrôlant la première étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ? Nous avons analysé l'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* dans les sacs à jus de l'orange Shamouti (*C. sinensis*, appartenant au groupe des mandarines), du citron Eureka (*C. limon*, appartenant au groupe des cédrats) et du pamplemousse Deep Red (*C. maxima*, appartenant au groupe des pamplemousses). Le gène *Dxs* a été inclu dans ces analyses car les études chez la tomate ont montré que l'expression de ce gène et celle du gène *Psy* étaient coordonnées (LOIS *et al.*, 2000 ; BRAMLEY, 2002 ; BOTELLA-PAVIA et RODRIGUEZ-CONCEPTION, 2006 ; SANDMANN *et al.*, 2006). Il est à noter que nous avons fait le choix de ne pas étudier l'expression du gène *Lcy-e* car les quantités d'ARNm relevées pour ce gène étaient très faibles.

### **III.2.3.2. Résultats et discussion**

#### **III.2.3.2.1. Diversité des compositions en caroténoïdes des jus de trois variétés représentant trois espèces d'agrumes**

Nous avons analysé les compositions en caroténoïdes des jus de trois espèces différentes d'agrumes : orange Shamouti (*C. sinensis*), citron Eureka (*C. limon*) et pamplemousse Deep Red (*C. maxima*) représentant les trois grands groupes phénotypiques identifiés au chapitre III.1. Pour chaque variété, 15 fruits ont été récoltés en février 2006 dans la collection de San Giuliano. Les caroténoïdes ont été isolés, identifiés et quantifiés par analyse HPLC avec un détecteur à barrette de diodes. Les caractéristiques spectrales et l'identification des composés sont détaillées dans le Tableau 3, 1<sup>er</sup> article, chapitre III.1. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne d'au moins trois mesures (Tableaux 9, 10 et 11). Les données ont été soumises à une analyse statistique pour déterminer les différences significatives. Les valeurs entre les trois variétés sont significativement différentes pour l'ensemble des caroténoïdes ( $P < 0,01 \%$ ).

**Tableau 9.** Concentrations des principaux caroténoïdes dans les jus de trois espèces.

		Phytoène	Phytofluène	ζ-Carotène	Lycopène	β-Carotène	β-Cryptoxanthine	Zéaxanthine	cis-Anthéranthine	cis-Violaxanthine
<b>Orange Shamouti</b>	<b>moyenne (mg L<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>	<b>0,49a</b>	<b>0,61a</b>	<b>0,61a</b>	<b>-<sup>b</sup></b>	<b>0,20b</b>	<b>3,16a</b>	<b>0,79</b>	<b>1,71</b>	<b>8,90</b>
	écart-type	0,03	0,04	0,03	-	0,02	0,12	0,04	0,02	0,26
<b>Citron Eureka</b>	<b>moyenne (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,03b</b>	<b>0,03b</b>	<b>tr<sup>c</sup></b>	-	<b>0,04c</b>	<b>0,24b</b>	-	-	-
	écart-type	0,00	0,00	-	-	0,00	0,01	-	-	-
<b>Pamplemousse Deep Red</b>	<b>moyenne (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,04b</b>	<b>0,03b</b>	<b>0,05b</b>	<b>0,91</b>	<b>0,59a</b>	-	-	-	-
	écart-type	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	-	-	-	-

<sup>a</sup>correspond à la moyenne de trois analyses. <sup>b</sup>non détecté. <sup>c</sup>traces, en dessous de la limite de quantification. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives entre les génotypes (P<0,01%). La limite de détection (LOD) et la limite de Quantification (LOQ) ont été déterminées pour la β-cryptoxanthine : LOD = 0,0046 µg et LOQ = 0,0152 µg

**Tableau 10.** Teneurs en caroténoïdes totaux dans les jus de trois espèces

		Teneurs en caroténoïdes totaux <sup>a</sup>
<b>Orange Shamouti</b>	<b>moyenne (mg L<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	<b>23,40a</b>
	écart-type	0,79
<b>Citron Eureka</b>	<b>moyenne (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,38c</b>
	écart-type	0,02
<b>Pamplemousse Deep Red</b>	<b>moyenne (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>1,73b</b>
	écart-type	0,02

<sup>a</sup>représente la somme des concentrations des caroténoïdes isolés et quantifiés. <sup>b</sup>correspond à la moyenne de trois analyses. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les génotypes (P<0,01%).

**Tableau 11.** Pourcentages des principaux caroténoïdes dans les jus de trois espèces

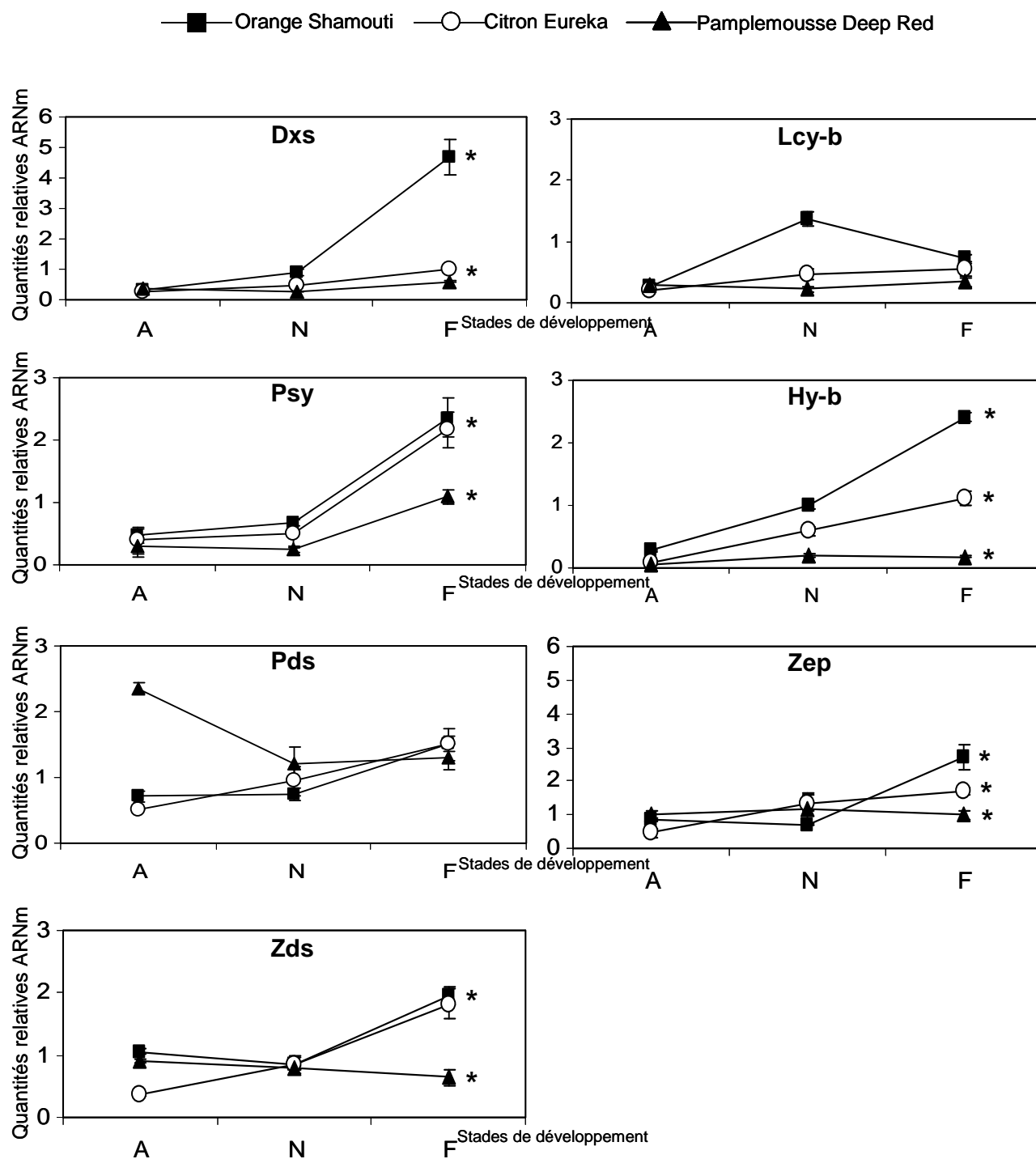
		Phytoène	Phytofluène	ζ-Carotène	Lycopène	β-Carotène	β-Cryptoxanthine	Zéaxanthine	cis-Anthéranthine	cis-Violaxanthine
<b>Orange Shamouti</b>	<b>moyenne (%)<sup>a</sup></b>	<b>2,06b</b>	<b>2,56b</b>	<b>2,57a</b>	<b>-<sup>b</sup></b>	<b>0,83c</b>	<b>14,99b</b>	<b>3,33</b>	<b>7,20</b>	<b>37,41</b>
	écart-type	0,05	0,09	0,07	-	0,05	0,16	0,12	0,25	0,31
<b>Citron Eureka</b>	<b>moyenne (%)</b>	<b>6,34a</b>	<b>7,67a</b>	<b>tr<sup>c</sup></b>	-	<b>10,55b</b>	<b>66,71a</b>	-	-	-
	écart-type	0,38	0,37	-	-	0,53	0,76	-	-	-
<b>Pamplemousse Deep Red</b>	<b>moyenne (%)</b>	<b>2,14b</b>	<b>1,65c</b>	<b>2,23a</b>	<b>59,34</b>	<b>29,13a</b>	-	-	-	-
	écart-type	0,11	0,03	0,31	0,65	0,90	-	-	-	-

<sup>a</sup>correspond à la moyenne de trois analyses, les pourcentages sont calculés à partir du rapport surface du pic du composé relevée à la longueur d'onde d'absorption maximale / somme des surfaces des pics de tous les caroténoïdes isolés et quantifiés. <sup>b</sup>non détecté. <sup>c</sup>traces, en dessous de la limite de quantification. Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives entre les génotypes (P<0,01%).

Les trois variétés présentent des profils très différents d'un point de vue qualitatif et quantitatif. L'orange Shamouti présente des carotènes (phytoène, phytofluène,  $\zeta$ -carotène et  $\beta$ -carotène) mais accumule surtout des  $\beta,\beta$ -xanthophylles ( $\beta$ -cryptoxanthine, zéaxanthine, *cis*-anthéroxanthine et *cis*-violaxanthine) (voir Tableaux 9 et 11). Le pourcentage de *cis*-violaxanthine s'élève à 37,41% et le pourcentage de  $\beta$ -cryptoxanthine à 14,99% dans les jus de l'orange Shamouti. Le citron Eureka présente des carotènes (phytoène, phytofluène et  $\beta$ -carotène) et de la  $\beta$ -cryptoxanthine. Dans les jus de cette variété, le pourcentage de  $\beta$ -cryptoxanthine s'élève à 66,71%. Cependant, le citron Eureka avec une concentration en caroténoïdes totaux de  $0,38 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$  est caractérisé par de très faibles teneurs en caroténoïdes (Tableau 10). Le citron Eureka est aussi caractérisé par l'absence de *cis*-violaxanthine. Le pamplemousse Deep Red n'accumule que des carotènes : phytoène, phytofluène,  $\zeta$ -carotène, lycopène et  $\beta$ -carotène en faibles quantités. Le lycopène représente 59,34 % des caroténoïdes tandis que le  $\beta$ -carotène correspond à 29,13 %. De plus, le pamplemousse avec une concentration en caroténoïdes totaux de  $1,73 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$  accumule peu de caroténoïdes (Tableau 10).

#### III.2.3.2.2. Expression de sept gènes de biosynthèse dans les sacs à jus de trois variétés représentant trois espèces d'agrumes

Nous avons déterminé le niveau d'expression sept gènes (*Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep*) à trois stades de développement (août, novembre et février) dans les sacs à jus de trois variétés par PCR en temps réel. Les valeurs sont des moyennes d'au moins trois mesures. Les données ont été soumises à une analyse statistique pour déterminer les différences significatives à chaque date entre les trois variétés pour chaque gène. Les profils d'expression sont présentés dans la Figure 22.



**Figure 22.** Expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* dans les sacs à jus de trois espèces d'agrumes : orange Shamouti (*C. sinensis*), citron Eureka (*C. limon*), pamplemousse Deep Red (*C. maxima*) à trois stades de développement A, août, N, novembre, F, février. L'abondance relative des transcrits a été déterminée par PCR en temps réel. Nous avons choisi des unités arbitraires pour l'échelle des ordonnées. Différentes échelles ont été utilisées. Les valeurs pour les ARNm correspondent à la moyenne d'au moins trois mesures. Les astérisques indiquent des mesures significativement différentes entre les génotypes en février ( $P < 0,01\%$ ).



Nous distinguons trois types de profils. Les profils d'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Hy-b* et *Zep* présentent des similitudes. Pour ces gènes et pour les trois variétés, le niveau des transcrits augmente peu d'août à novembre. En revanche, le niveau d'expression de *Dxs*, *Psy*, *Hy-b* et *Zep* augmente fortement de novembre à février dans les sacs à jus de l'orange Shamouti. Dans les sacs à jus du citron Eureka les quantités de transcrits de *Psy* et *Hy-b* augmentent tandis que les quantités de transcrits des gènes *Dxs* et *Zep* augmentent faiblement de novembre à février. Entre novembre et février, dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red, le niveau d'expression du gène *Psy* augmente tandis que le niveau d'expression des gènes *Dxs*, *Hy-b* et *Zep* ne varie pas de façon significative et reste faible. Ainsi, en février, nous relevons des différences significatives entre les trois variétés. L'expression du gène *Dxs* dans les sacs à jus de l'orange Shamouti est respectivement 4,6 et 7,8 fois supérieure à celle obtenue dans les fruits du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red. Pour *Psy*, nous ne relevons pas de différence entre l'orange et le citron en février tandis que le niveau d'expression de *Psy* dans le pamplemousse est environ deux fois plus faible. Pour les gènes *Hy-b* et *Zep* nous mesurons des quantités de transcrits significativement différentes dans les trois variétés avec les plus fortes valeurs obtenues pour l'orange Shamouti, des valeurs intermédiaires pour le citron Eureka et les plus faibles valeurs relevées pour le pamplemousse Deep Red. L'expression du gène *Hy-b* est environ deux fois plus importante dans l'orange que dans le citron tandis qu'elle est 13,5 fois plus élevée dans l'orange que dans le pamplemousse. Dans le cas de *Zep*, les transcrits dans les sacs à jus de l'orange sont respectivement 1,6 et 2,7 fois plus élevés que dans les fruits du citron et du pamplemousse.

En ce qui concerne les gènes *Pds* et *Zds*, codant pour les deux désaturases, le niveau d'expression augmente dans les sacs à jus de l'orange Shamouti et du citron Eureka de novembre à février et il n'y a pas de différence significative pour ces deux variétés en février. Les profils d'expression de ces deux gènes sont différents dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red. Les quantités d'ARNm diminuent au cours du développement des fruits. En février, les quantités d'ARNm du gène *Zds* dans les sacs à jus du pamplemousse sont 3 fois inférieures à celles mesurées dans les sacs à jus de l'orange et du citron.

Enfin, l'expression du gène *Lcy-b* varie peu dans les sacs à jus du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red au cours du développement des fruits tandis que le niveau d'expression augmente d'août à novembre dans les fruits de l'orange puis diminue de novembre en février. En février, les différences entre les trois variétés sont faibles.

### III.2.3.2.3. Relations entre le niveau d'expression de sept gènes et la diversité des compositions en caroténoïdes au niveau interspécifique

Les résultats suggèrent que les concentrations en caroténoïdes totaux sont liées au niveau d'expression des gènes *Dxs* et *Psy*. Ainsi, le niveau d'expression de ces deux gènes augmente dans les sacs à jus de l'orange Shamouti au cours de la maturation des fruits ce qui semble conduire à des teneurs élevées en caroténoïdes. Dans le cas du citron et du pamplemousse les faibles concentrations en caroténoïdes totaux semblent liées aux faibles quantités de transcrits pour *Dxs* en février. Des résultats similaires ont été obtenus dans les fruits de la tomate où l'accumulation des caroténoïdes paraît liée à l'augmentation de l'expression des deux gènes *Dxs* et *Psy* (LOIS *et al.*, 2000). Dans le cas du citron, les travaux de KATO *et al.* (2006) suggèrent que les faibles teneurs en caroténoïdes et l'absence de *cis*-violaxanthine sont dues à l'utilisation de cette dernière pour former l'acide abscissique et à la surexpression du gène *CitNced2* impliqué dans cette étape de la synthèse de ce composé. D'après ces auteurs, dans les sacs à jus de l'orange Valencia, les gènes *Nced* sont peu exprimés ce qui entraîne une accumulation de *cis*-violaxanthine. Ainsi, le phénotype du citron semble être expliqué par deux phénomènes : (a) les faibles teneurs en caroténoïdes seraient liées à un faible niveau d'expression du gène *Dxs*; (b) la surexpression de *Nced* serait responsable de l'absence de violaxanthine et d'une diminution de la concentration en caroténoïde totaux.

L'accumulation des  $\beta,\beta$ -xanthophylles dans les sacs à jus de l'orange Shamouti paraît liée à l'augmentation du niveau d'expression de ces sept gènes au cours de la maturation des fruits et à une faible expression des gènes *Nced*.

Enfin l'accumulation des carotènes et du lycopène en particulier dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red paraît liée aux profils d'expression des gènes *Pds*, *Zds* et *Lcy-b*. Nous soulignons que le niveau d'expression du gène *Lcy-b* ne varie pas dans les sacs à jus du pamplemousse et reste faible. Une absence d'amplification en PCR en temps réel, due à un non appariement des amorces du fait d'une trop grande diversité dans la séquence codante chez le pamplemousse Deep Red, pourrait être à l'origine de ce résultat. Cependant, nous avons séquencé le gène *Lcy-b* chez le pamplemousse sans pépin et dans les bases de données, nous disposons d'une séquence obtenue à partir d'un pamplemousse, numéro d'accension GenBank : AF217103, et d'une autre obtenue à partir d'un pomelo AF152246. Dans ces trois séquences, nous retrouvons les deux fragments ayant servi comme site d'amorçage pour les

analyses en PCR en temps réel et à chaque fois ces fragments sont identiques aux amorces définies. Dans ces conditions, le profil d'expression obtenu pour le gène *Lcy-b* dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red ne résulterait pas d'un problème d'amplification. Il est à souligner que les quantités de transcrits pour le gène *Hy-b* sont en février 13,5 fois inférieures dans les sacs à jus du pamplemousse par rapport aux valeurs mesurées dans les fruits de l'orange. Ceci expliquerait l'absence de  $\beta$ -cryptoxanthine dans les jus du pamplemousse Deep Red.

### **III.3. ORIGINE DE LA DIFFERENCIATION PHENOTYPIQUE INTRASPECIFIQUE, ROLE DE L'EXPRESSION DES GENES DE BIOSYNTHESE DES CAROTENOIDES**

#### **III.3.1. Rôle de l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes**

Nous avons formulé l'hypothèse que la variabilité phénotypique intraspécifique d'ordre quantitatif serait préférentiellement liée à une expression différentielle des gènes de biosynthèse des caroténoïdes chez des variétés d'une même espèce. Nous avons mis en évidence des variations quantitatives importantes en ce qui concerne les teneurs en caroténoïdes déterminées dans les jus des quatre variétés d'orange (*C. sinensis*, cultivars Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel, Huang pi Chen). Dans notre analyse globale du genre *Citrus* sur la base de l'absence ou présence des différents caroténoïdes, ces quatre variétés d'orange appartiennent au groupe des mandarines et synthétisent de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la violaxanthine. Cependant, sur la base des concentrations en caroténoïdes, le groupe des oranges apparaît plus dispersé et nous avons relevé des fortes variations dans les teneurs en caroténoïdes totaux et les teneurs en carotènes. Ainsi, nous avons choisi d'analyser les oranges pour l'étude de la différenciation phénotypique intraspécifique et du rôle de l'expression des gènes de biosynthèse. Nous rappelons également que les analyses RFLP et SSR ne nous ont pas permis de mettre en évidence du polymorphisme dans ou autour des séquences des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* entre ces quatre variétés d'orange. Ceci est cohérent avec l'origine de la variabilité intraspécifique au sein de l'espèce *C. sinensis*. L'ensemble des variétés d'orange découlent en effet d'un prototype hybride, par accumulation de mutations ou variations sans intervention de la recombinaison sexuée (OLLITRAULT *et al.*, 2000). La probabilité de mettre en évidence des mutations ponctuelles avec ces deux outils moléculaires est minime compte tenu de la faible quantité de bases explorées par les sites de restriction RFLP et les marqueurs SSR.

L'analyse de l'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, *Zep* dans les sacs à jus des quatre oranges au cours de la maturation des fruits permettra d'étudier les liens entre variations intraspécifiques et régulation au niveau de l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes. Précédemment nous avons analysé l'expression du gène *Dxs* dans les sacs à jus de l'orange Shamouti, du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red et nous avons suggéré que le niveau d'expression de ce gène influence la synthèse des caroténoïdes. Ainsi,

nous analysons également l'expression de ce gène chez les quatre variétés d'oranges afin de compléter ces premiers résultats.

Titre : Les variations des teneurs en caroténoïdes et de l'expression des gènes de biosynthèse dans la pulpe de quatre variétés d'orange (*C. sinensis*) présentant des couleurs contrastées.

### **III.3.1.1...Résumé**

Le premier objectif de cette étude est d'analyser le rôle de l'expression de sept gènes dans l'accumulation différentielle des caroténoïdes dans les sacs à jus de quatre oranges (*C. sinensis*) présentant des colorations contrastées. Les compositions en caroténoïdes dans les jus de quatre oranges (cultivars, Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel et Huang pi Chen), récoltées en février 2006, ont été analysées par HPLC en utilisant un appareil Agilent 1100, muni d'une colonne C<sub>30</sub> et d'un détecteur à barrette de diodes. L'expression de sept gènes (*Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep*) a été déterminée par PCR en temps réel dans les sacs à jus des quatre oranges à trois stades de développement des fruits (août, novembre et février). Les quatre oranges présentent des compositions en caroténoïdes contrastées. Deux variétés, l'orange Shamouti et l'orange Sanguinelli, accumulent principalement des  $\beta,\beta$ -xanthophylles tandis que l'orange Cara Cara navel accumule des carotènes en plus de la *cis*-violaxanthine. L'orange Huang pi Chen est caractérisée par de très faibles teneurs en caroténoïdes par rapport aux autres oranges. L'expression des gènes de biosynthèse est faible en août (avant la coloration des fruits) et comparable dans les fruits des quatre variétés tandis qu'en novembre (fruits tournants) l'expression des gènes *Dxs*, *Zds*, *Hy-b* et *Zep* est supérieure dans les sacs à jus des oranges Cara Cara et Huang pi Chen comparée au niveaux d'expression dans les deux autres oranges. Les résultats suggèrent que l'accumulation des  $\beta,\beta$ -xanthophylles en février dans les sacs à jus des oranges Shamouti et Sanguinelli est liée à l'augmentation de l'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Hy-b* et *Zep*. Nous montrons également que le phénotype de l'orange Huang pi Chen peut être sous le contrôle de l'expression de deux gènes *Dxs* et *Psy* qui sont sous-exprimés dans les sacs à jus de cette orange. De plus, l'expression des gènes *Dxs* et *Psy* serait coordonnée au cours de la maturation des oranges. L'accumulation préférentielle des carotènes linéaires dans les sacs à jus de l'orange Cara Cara navel ne serait pas due à la régulation des gènes de biosynthèse au niveau transcriptionnel.

### **III.3.1.2...Article**

Titre: Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit colour

FANCIULLINO, A. L.; CERCOS, M.; DHUIQUE-MAYER, C.; FROELICHER, Y.;  
TALON, M.; OLLITRAULT, P. MORILLON, R.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Article soumis.

## Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit colour

ANNE-LAURE FANCIULLINO<sup>1</sup>, MANUEL CERCOS<sup>2</sup>, CLAUDIE DHUIQUE-MAYER<sup>3</sup>, YANN FROELICHER<sup>1</sup>, MANUEL TALON<sup>2</sup>, PATRICK OLLITRAULT<sup>1</sup>, RAPHAËL MORILLON<sup>1\*</sup>.

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, Avenue Agropolis - TA A-75 / 02 - 34398 Montpellier cedex 5, France; Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Centro de Genómica, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Valencia, Spain; CIRAD, UMR QUALISUD Avenue J. F. Breton - TA B-95 / 16 - 34398 Montpellier Cedex 5, France.

The contribution of carotenoid composition to the colour range of the fruit juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh colour, namely Shamouti (normal orange colour), Sanguinelli ("blood cultivar" purple colour), Cara Cara navel (pink-reddish), and Huang pi Chen (yellowish colour) was investigated. To this end, qualitative and quantitative analyses of carotenoid contents were first performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a C<sub>30</sub> column and a photodiode array detector in February, at a late developmental fruit stage. Concomitantly, transcript levels of *Dxs*, the gene controlling the first step of the MEP pathway and six genes involved in  $\beta,\beta$ -xanthophylls biosynthesis (*Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, and *Zep*) were determined in August, November and February. Transcript level measurement was carried out by real-time RT-PCR on total RNA from juice sacs. The four orange varieties displayed different carotenoid profiles. Shamouti and Sanguinelli oranges accumulated mainly  $\beta,\beta$ -xanthophylls as expected in typically coloured oranges, whereas Cara Cara navel orange accumulated linear carotenes in addition to *cis*-violaxanthin. Huang pi Chen fruit flesh orange was characterized by a strong reduction of total carotenoid content. While gene expression was relatively low and similar in August (before colour break) in all four varieties, in November (during colour break), *Dxs*, *Zds*, *Hy-b* and *Zep* expression was higher in Cara Cara and Huang pi Chen oranges. The  $\beta,\beta$ -xanthophylls accumulation observed in February in Shamouti and Sanguinelli oranges was apparently related to the increase of transcript levels of all measured genes (i.e.. *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Hy-b*, and *Zep*) except *Lcy-b*. At this time, however, transcript levels in Cara Cara were rather similar to those found in Sanguinelli, although both showed different carotenoid composition. The Huang pi Chen phenotype correlated with lower expression of *Dxs* and *Psy* genes. PCA statistical analyses among carotenoids and gene expression separated the four varieties in three groups clustering together Shamouti and Sanguinelli varieties. These results revealed a general pattern of transcript change in juice sacs of citrus fruit, characterized by an apparent coordination of *Dxs* and *Psy* expression and a general increase in mRNA levels of carotenoid biosynthetic genes. These transcript changes correlated well with the  $\beta,\beta$ -xanthophyll accumulation, the normal carotenoid set, observed in Shamouti and Sanguinelli oranges and suggest that the preferential accumulation of linear carotenes in Cara Cara navel and the practically absence of carotenoids in Huang pi Chen oranges were not predominantly due to changes in regulation of carotenoid biosynthetic genes at the transcriptional level.

**KEYWORDS:** *Citrus sinensis*, carotenoids, gene expression, allelic variability, regulation mechanisms.

### INTRODUCTION

Carotenoids are pigments that play an important role in *Citrus* fruit quality. The colour of the peel and pulp is mainly due to carotenoid accumulation in chromoplasts although other pigments such anthocyanins may also contribute to pigmentation (1). Moreover, carotenoids have nutritional value: they are pro-vitamin A and they have antioxidant properties (2-6) that confer them a role in cancer and cardiovascular diseases prevention (7-8).

*Citrus* fruits generally display complex carotenoid profiles which depend on several factors including genetic factors, maturation stages and environmental conditions. Carotenoid accumulation occurred in juice sacs of *Citrus* during fruit maturation. During the green stage of the flavedo, juice sacs of mandarin (*C. unshiu*), orange (*C. sinensis*) and lemon (*C. limon*) were characterized by low contents in total carotenoids, the  $\beta,\beta$ -xanthophylls accumulated after the green stage (9). Genetic factors were also shown to play an important role in *Citrus* carotenoid composition when other sources of variation as maturation stage, geographical origin and cultural practices were minimized (10). According to our previous work, on the basis of carotenoid qualitative compositions of juices, *Citrus* species were clustered in three groups: the mandarin (*C. reticulata*) cluster, the citron (*C. medica*) cluster and the pummelo (*C. maxima*) cluster. Orange (*C. sinensis*) varieties belonged to the mandarin cluster and at commercial maturity were characterized by  $\beta,\beta$ -xanthophylls (mainly violaxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin) accumulation in juice sacs of fruits.

\*Author to whom correspondence should be addressed.. Tel: +(34) 963 424 143. Fax: +(34) 963 424 106. E-mail: raphael.morillon@cirad.fr

<sup>1</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative, Avenue Agropolis - TA A-75 / 02 - 34398 Montpellier cedex 5, France;

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Centro de Genómica, Ctra. Moncada-Náquera Km 5, 46113 Moncada, Espagne;

<sup>3</sup>CIRAD, UMR QUALISUD Avenue J. F. Breton - TA B-95 / 16 - 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Orange juices contained lower  $\beta$ -cryptoxanthin levels than mandarins (9-12). However, quantitative differences were found among different orange varieties. Lee and Castle (13) found differences between Hamlin, Earlygold and Budd Blood orange juices in carotenoid accumulation during the maturation period. Violaxanthin was one of the main pigments in the three varieties but its contents changed from one variety to another. Cara Cara navel orange was characterized by the accumulation of linear carotenoids in parallel to the accumulation of violaxanthin (14).

Carotenoid biosynthetic pathway has been well established (15-16) but further information concerning the role of each biosynthetic step in the control of the flux of intermediates of the carotenoid pathway in *Citrus* fruits is required. Indeed, carotenoids are synthesized in chloroplasts and chromoplasts by nuclear-encoded enzymes. The immediate precursor of carotenoids (and also of gibberellins, chlorophylls, phyloquinones, and tocopherols) is the geranylgeranyl diphosphate (GGPP). The condensation of two molecules of GGPP catalyzed by phytoene synthase (PSY), leads to the first colourless carotenoid: phytoene. Precursors of carotenoids synthesized in chloroplasts and chromoplasts derive mostly from the plastidial methylerythritol phosphate (MEP) pathway (17-18). The coordination of the MEP pathway and the carotenoid pathway was shown to be involved in the regulation of carotenoid accumulation in tomato fruits (19-20). Previous study on the flavedo of *Citrus clementina* showed that the deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS) and PSY, the first enzymes of the MEP and carotenoid biosynthetic pathway respectively, were involved in the control of carotenoid biosynthesis (21). To date, there is no data on the coordination of the MEP pathway and the carotenoid pathway during carotenoid biosynthesis in the juice sacs of *Citrus* fruit. The red lycopene is synthesized by the action of two desaturases: phytoene desaturase (PDS) and  $\zeta$ -carotene desaturase (ZDS) in four steps. Cyclization of lycopene is a branching point: one branch leads to  $\beta$ -carotene and the other to  $\alpha$ -carotene. Lycopene  $\beta$ -cyclase (LCY-b) then converts lycopene into  $\beta$ -carotene in two steps whereas the formation of  $\alpha$ -carotene requires the action of two enzymes: lycopene  $\epsilon$ -cyclase (LCY-e) and Lycopene  $\beta$ -cyclase (LCY-b) (22). According to Ronen *et al.* (23) the steps catalyzed by the two lycopene cyclases were involved in the accumulation of lycopene in tomato fruit. The synthesis of  $\beta$ -cryptoxanthin, one of the main pigments in the juice sacs of *Citrus* fruit is carried out in two steps by the LCY-b and the  $\beta$ -carotene hydroxylase (HY-b). Violaxanthin is synthesized from the  $\beta$ -cryptoxanthin in three steps: one step catalyzed by HY-b and two steps by zeaxanthin epoxidase (ZEP). The *Hy-b* and *Zep* genes should play an important role in the differential carotenoid accumulation in the juice sacs of mandarin and orange fruits (9-10). Violaxanthin is converted into neoxanthin by the action of neoxanthin synthase (NSY). However, neoxanthin has not been identified in juice sacs of mandarin and orange (24). The catabolism of some carotenoids influenced carotenoid accumulation, mainly *cis*-violaxanthin accumulation. The enzyme 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) which catalyzes a limiting step in abscisic acid (ABA) biosynthesis was shown to be involved in the regulation of carotenoid accumulation in the pulp of *Citrus* fruit (24).

The regulation mechanisms of carotenoid accumulation during fruit maturation have been investigated by numerous studies. Works on tomato fruit suggested that the regulation of carotenoid biosynthesis was predominantly controlled at the transcriptional level (23, 25-26). Lycopene accumulation would be due to the concomitant upregulation of phytoene synthase and phytoene desaturase and downregulation of lycopene cyclases. However, results in apricot (*Prunus armeniaca*) fruit showed that carotenoid accumulation was not correlated with the regulation of the expression of *Zds* gene involved in  $\beta$ -carotene synthesis (27). Post-transcriptional regulation, feed-back regulation by end-products and metabolic regulation (ethylene) were suggested as other regulation mechanisms in carotenoid accumulation. In the peel of orange fruit, during fruit maturation, the change from the  $\beta,\epsilon$ -carotenoids to the  $\beta,\beta$ -carotenoids was explained by the downregulation of LCY-e and the upregulation of LCY-b and HY-b (9, 28). According to Ikoma *et al.* (29), the accumulation of carotenoids in both the peel and juice sacs of Satsuma mandarin (*C. unshiu*) was in agreement with the increase of *CitPsy1* transcript. The *CitPsy1* and *CitPds1* transcripts increased with the synthesis of carotenoids in the juice sacs of Satsuma mandarin whereas in the peel, the level of *CitPds1* transcript was not coordinated with the level of *CitPsy1* transcripts (30). Mandarin fruits accumulated high amounts of  $\beta$ -cryptoxanthin in the peel and in the juice sacs during fruit maturation but the levels of *Chx1* (or *Hy-b*) and *Chx2* transcripts were consistent in peel and juice sacs during all stages of fruit maturation, indicating that *Chx1* and *Chx2* genes were not regulated at the transcriptional level (31). Only one study analyzed carotenoid biosynthesis in the juice sacs of several *Citrus* varieties and species investigating the expression of seven biosynthetic genes (9). According to these authors, in juice sacs of Satsuma mandarin and Valencia orange, a simultaneous increase in the expression of *CitPsy*, *CitPds*, *CitZds*, *CitLcyb*, *CitHyb*, and *CitZep* genes led to massive  $\beta,\beta$ -xanthophylls accumulation. Moreover, the predominant 9-*cis*-violaxanthin accumulation in juice sacs of Valencia orange would be due to a low expression of *CitNced2* gene with a low ABA synthesis (24). Conversely, in lemon juice sacs, the low total carotenoid content could be explained by the upregulation of *CitNced2* and also a lower expression of the gene set involved in the production of  $\beta,\beta$ -xanthophylls (24). In some cases, carotenoid accumulation in fruits has been well correlated with carotenogenic gene expression, but in *Citrus* fruit, in some varieties, the expression of *Pds* and *Hy-b* genes could not be related to carotenoid biosynthesis. Furthermore, only few studies have compared several *Citrus* varieties characterized by different carotenoid compositions. Therefore, further information concerning carotenoid accumulation in *Citrus* fruit and carotenogenic gene expression is required. Although one study has analyzed carotenoid catabolism (24) in juice sacs of *Citrus* fruits, there are no data on MEP and carotenoid pathway interactions and their implications in carotenoid accumulation in juice sacs. Only Alos *et al.* (21) have analyzed the role of DXS in carotenoid biosynthesis in the peel of *Citrus* fruit. These authors showed that *Dxs* and *Psy* expression were not coordinated but that the highest expression of *Dxs* coincided with a peak in total carotenoid and chlorophyll abundance suggesting that there is a competition between carotenoid and chlorophyll pathways for GGPP precursor.



The objective of this paper was to identify what regulatory mechanisms are involved in the different carotenoid composition in juices of four orange varieties belonging to the same *Citrus* species. Our study aimed to answer the following questions: is the intraspecific diversity observed in the carotenoid accumulation regulated at the transcriptional level in *Citrus* fruit?

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials

**Table 1.** List of genotypes

no.	common name	Tanaka system	ICVN no. <sup>a</sup>
1	Shamouti orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100299
2	Sanguinelli orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100243
3	Cara Cara navel orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100666
4	Huang pi Chen orange	<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.	0100567

<sup>a</sup> International Citrus variety numbering



**Figure 1.** Fruits of four oranges differing in flesh colour.

Fruits of four orange varieties [*C. sinensis* (L.) Osb.] (**Table 1**) were harvested at three different developmental stages from August to February during the 2005-2006 season. The varieties used in this study were Shamouti (normal orange colour), Sanguinelli ("blood cultivar" purple colour and relatively high anthocyanin levels, Cara Cara navel (pink-reddish), and Huang pi Chen (yellowish colours) (see **Figure 1**).

Fruits were collected from adult trees grown at the germplasm collection of *Station de Recherches Agronomiques* of INRA-CIRAD of San Giuliano and subjected to standard cultural practices. For each genotype, at each maturation stage, 15 fruits were collected from three individual plants growing in the same field, and grafted on the same rootstock variety. RNA extraction was performed from juice sacs of these four orange varieties harvested at three developmental stages: (1) in August, [stage II, Bain, (32)], with an average diameter of  $4.7 \pm 0.2$ ;  $4.9 \pm 0.4$ ;  $5.7 \pm 0.2$ ;  $5.1 \pm 0.2$  cm for Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel, and

Huang pi Chen orange respectively; (2) in November (beginning of stage III), with an average diameter of  $7.0 \pm 0.3$ ;  $5.4 \pm 0.1$ ;  $8.4 \pm 0.5$ ;  $7.2 \pm 0.4$  cm for Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel, and Huang pi Chen orange respectively; (3) in February (stage III), with an average diameter of  $7.2 \pm 0.6$ ;  $6.2 \pm 0.1$ ;  $8.6 \pm 0.4$ ;  $8.3 \pm 0.3$  cm for Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel, and Huang pi Chen orange respectively.

Huang pi Chen orange produces distinctive yellow fruits. The conformity of Huang pi Chen nuclear and cytoplasmic genomes to those of *C. sinensis* was tested with Simple Sequence Repeat (SSR) markers before carotenoid and RT-PCR analyses. Ten nuclear markers: mCrCIR07D07, mCrCIR01D06, mCrCIR06B05, mCrCIR01E02, mCrCIR01F04, mCrCIR01F08, CI01H05, CI02F03, CI07C07, and CI08C05 (33) and four chloroplastic markers: NTCP 9, CCMP6, SSCP 11, and SSCP 9 (34) were used. DNA extraction was performed from fresh leaves according to Doyle & Doyle (35). PCR amplifications, polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining were carried out according to the method of Froelicher *et al.* (33).

### Carotenoid analysis

Carotenoid analysis was performed on the juice sacs of fruits harvested at the last developmental stage [stage III, Bain, (32)] in February 2006. Fruit maturity was estimated using commercial maturity indicators (36-37): juice content, soluble solid content (SSC), titratable acidity (TA) and maturity index (SSC/TA ratio) (**Table 2**). Juice content was expressed as percentage of fruit weight. Titratable acidity (TA) of juices was determined by titration to pH 8.2 with  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH and expressed as percentage of anhydrous citric acid and soluble solid content (SSC) was determined with a refractometer (Atago model 0-32%, Japan). Maturity index was evaluated as the SSC/TA ratio. Juice colour was measured at the last developmental stage in February using a Minolta CR-310 colorimeter. An aliquot of each juice was analyzed using a plate (diameter of 5 cm) and a white background. Blank measurements were made with the plate filled with distilled water. The colour parameters  $L^*$  (taking values within the range 0-100, correspond from black to white),  $a^*$  (negative to positive, from green to red) and  $b^*$  (negative to positive, from blue to yellow) (38) are presented in **Table 2**.

Carotenoids were extracted and analysed according to Dhuique-Mayer *et al.* (12) and Fanciullino *et al.* (10). Briefly, carotenoids were extracted from 20 g of juice (stirred with 120 mg of  $\text{MgCO}_3$ ) with a mixture of 35 mL of ethanol/hexane, 4:3 v/v, containing 0.1% of BHT as antioxidant. Lycopene (750  $\mu\text{L}$  of solution, equivalent to 90  $\mu\text{g}$ ) or  $\beta$ -apo-8'-carotenal (150  $\mu\text{L}$ , equivalent to 40  $\mu\text{g}$ ) was added as an internal standard. Residue was separated from the liquid phase by filtration through a

**Table 2.** Characteristics of orange juices in February.

no.	common name	diameter (cm $\pm$ SD) <sup>a</sup>	juice content (% $\pm$ SD)	maturity index $\pm$ SD <sup>b</sup>	Colour parameters <sup>c</sup>		
					$L^*\pm$ SD	$a^*\pm$ SD	$b^*\pm$ SD
1	Shamouti orange	$7.2\pm 0.6$	$32.3\pm 1.4$	$7.9\pm 0.5$	$61.9\pm 0.2$	$7.7\pm 0.2$	$55.1\pm 0.6$
2	Sanguinelli orange	$6.2\pm 0.1$	$33.8\pm 2.5$	$7.1\pm 0.5$	$33.0\pm 1.4$	$32.3\pm 0.9$	$15.0\pm 1.7$
3	Cara Cara navel orange	$8.6\pm 0.4$	$42.4\pm 3.0$	$10.6\pm 0.4$	$58.6\pm 0.1$	$11.0\pm 0.4$	$48.4\pm 0.1$
4	Huang pi Chen orange	$8.3\pm 0.3$	$40.3\pm 2.5$	$6.8\pm 0.2$	$68.8\pm 0.2$	$-10.4\pm 0.2$	$44.6\pm 0.7$

<sup>a</sup>SD, standard deviation. <sup>b</sup>soluble solid content/titratable acidity ratio. <sup>c</sup>uniform colour space CIELAB (38),  $L^*$  (taking values within the range 0-100, correspond from black to white),  $a^*$  (negative to positive, from green to red) and  $b^*$  (negative to positive, from blue to yellow).

filter funnel (porosity no. 2). This residue was re-extracted with 35 mL of the previous solvent and then with 30 mL of ethanol and 30 mL of hexane until it was colourless. Organic phases were transferred to a separatory funnel and successively washed with  $2 \times 50$  mL of 10 % sodium chloride and  $3 \times 50$  mL of distilled water. The aqueous layer was removed. The hexanic phase was dried, redissolved in 20 mL of hexane and saponified overnight at room temperature using an equal volume of 10 % methanolic KOH. The sample was transferred to a separatory funnel to which 50 mL of distilled water was added to separate the layers. Hexanic layer was washed with distilled water until it was free of alkali. The methanolic KOH layer was extracted with  $3 \times 10$  mL of dichloromethane. The extracts were pooled and washed to remove alkali. The extracts were dried using anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated in a rotary evaporator. The residue was dissolved in 500  $\mu$ L of dichloromethane and 500  $\mu$ L of MTBE/methanol (80:20, v/v). This solution was diluted 6-fold in MTBE/methanol mixture for 3 orange varieties (cv. Shamouti, Sanguinelli, Cara Car navel). Analyses were carried out under red light to avoid carotenoid degradation during extraction and saponification.

Carotenoids were analyzed by high-performance liquid chromatography using an Agilent 1100 system (Massy, France). Carotenoids were separated along a C<sub>30</sub> column [250  $\times$  4.6 mm i. d., 5  $\mu$ m YMC (EUROP GmbH)]; the mobile phases were H<sub>2</sub>O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL min<sup>-1</sup>, column temperature was set at 25°C, and injection volume was 20  $\mu$ L. A gradient program was performed: the initial condition was 40 % A/60 % B; 0-5 min, 20 % A/80 % B; 5-10 min, 4% A/81 % B/15 % C; 10-60 min 4 % A/11 % B/85 % C; 60-71 min, 100 % B; 71-72 min, back to the initial condition for reequilibration. Absorbance was recorded at 290, 350, 400, 450, and 470 nm using an Agilent 1100 photodiode array detector. Chromatographic data and UV-visible spectra were collected, stored, and integrated using an Agilent Chemstation plus software.

Carotenoids were identified using their retention

times, absorption spectra, and co-injection with authentic standards. Standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France):  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, zeaxanthin, lutein, lycopene,  $\beta$ -apo-8'-carotenal. Quantification of carotenoids was achieved using calibration curves with  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein, lycopene and  $\beta$ -apo-8'-carotenal with five concentrations. Correlation coefficients ranged from 0.994 to 0.998. Other carotenoids were quantified as  $\beta$ -carotene. Each carotenoid was quantified using area collected at 290 or 350, 400, 450, 470 nm depending on its maximum  $\lambda$ . Recoveries were determined by adding an internal standard (lycopene or  $\beta$ -apo-8'-carotenal) before the extraction of each sample analyzed and used to correct carotenoid contents after HPLC analysis. The concentration of each carotenoid was expressed as mg L<sup>-1</sup>. The total contents in carotenoid pigments of juices were calculated by summing the concentrations of all compounds. The concentrations of carotenoid pigments were also expressed as relative percentage of total peak area. Analysis precision was checked from three consecutive extractions-saponifications-injections of the same sample and coefficients of variation were  $\leq 5\%$ . Concentrations were expressed as the mean of the data from three extractions. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated for  $\beta$ -cryptoxanthin by preparing serial dilutions of this compound in the mobile phase (concentrations ranging from 1 to 10 mg L<sup>-1</sup>). Calibration curves and then LOD and LOQ were determined with  $LOD = 3 \times S/a$  and  $LOQ = 10 \times S/a$  (where S is the standard deviation of the blank signal and a the slope of the calibration curve). An ANOVA test was performed with the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc. 1989) to analyse quantitative differences between orange varieties.

#### Total RNA isolation and RT-PCR analysis

Pulp of peeled fruits was immediately frozen under liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis. Total RNA was isolated from juice sacs as described by Manning (1991) (39) and cleaned up with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). DNase I treatment (RNase-Free

**Table 3.** Primer pairs used for gene expression analysis by real-time RT-PCR.

Gene	Primer	Primer amount <sup>a</sup>	Amplicon size
<i>Dxs</i> Forward	5'-CGTGTTCCTCAACACACCTGACG-3'	3.6 $\mu$ L	120 pb
<i>Dxs</i> Reverse	5'-AAGCCCCGAAGTCTTCCTCAT-3'	1.2 $\mu$ L	
<i>Psy</i> Forward	5'-GGTCGTCCATTTGATATGCTTG-3'	0.5 $\mu$ L	111 pb
<i>Psy</i> Reverse	5'-CCTAAGGTCCATCCTCATTCT-3'	0.5 $\mu$ L	
<i>Pds</i> Forward	5'-GACAAGGAAGGGTTTCTGTCC-3'	0.5 $\mu$ L	134 pb
<i>Pds</i> Reverse	5'-GCTTAGAAGGACGAGGAGAAG-3'	0.5 $\mu$ L	
<i>Zds</i> Forward	5'-CGATCCTTACATGCCCTTAC-3'	0.5 $\mu$ L	145 pb
<i>Zds</i> Reverse	5'-AGGTCCCTCACGGTACAAAG-3'	0.5 $\mu$ L	
<i>Lcy-b</i> Forward	5'-CCCATGTATGACCCATCAAAG-3'	0.5 $\mu$ L	130 pb
<i>Lcy-b</i> Reverse	5'-TGGGAGATGGATCAATCGAG-3'	0.5 $\mu$ L	
<i>Hy-b</i> Forward	5'-GGTGCTGGACTTGGCATTAC-3'	0.5 $\mu$ L	120 pb
<i>Hy-b</i> Reverse	5'-AGCGACTCTCCGGAATAAG-3'	0.5 $\mu$ L	
<i>Zep</i> Forward	5'-TTGGTTGATGGGATTCTGG-3'	0.5 $\mu$ L	134 pb
<i>Zep</i> Reverse	5'-TCCCCAACCGCTTTAGCTAG-3'	0.5 $\mu$ L	

<sup>a</sup>solution of 5 $\mu$ M.L<sup>-1</sup>. Gene-specific primers were designed with the use of primer3 software and corresponded to *Citrus* coding sequences available in databases of *Pds* (AB046992, AJ319761, AB114657), *Zds* (AB072343, AJ319762, AB114658), *Lcy-b* (AY166796, AY533826, AB114660), *Hy-b* (AF296158, AB114661, AY533828) and *Zep* (AB075547, AB114662, AY533829). Primer pairs specific to *Dxs* and *Psy* genes were designed Alós et al. (2006).

DNase Set; Qiagen) was applied in the purification column according to the manufacturer's instructions. UV absorption spectrophotometry and gel electrophoresis were performed to test RNA quality and integrity as described by Sambrook *et al.* (1989) (40).

#### RT-PCR

Quantitative mRNA analyses were performed according to the method described by Alós *et al.* (2006) (21). A Roche LightCycler 2.0 instrument was used with the LightCycler 4.0 software. RT-PCR was performed in a total volume of 10 µL with 50 ng total RNA, 2.5 units Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1 unit RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 2 µL LC FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche) and 2.5 µM specific primers (Table 3). Primer pairs for each biosynthetic gene were based on the corresponding *Citrus* coding sequences isolated from fruit and available in databases. The RT-PCR procedure consisted of 48°C 30 min, 95°C 10 min followed by 45 cycles at 95°C 2 seconds, 60°C 10 seconds and 72°C 15 seconds. Fluorescent intensity data were acquired during the 72°C extension step. Specificity of the amplification reactions was checked by post-amplification dissociation curves and by sequencing the reaction products. To transform fluorescent intensity measurements into relative mRNA levels, a 10-fold dilution series of a RNA sample was used as the standard curve. Total RNA amounts were accurately quantified with the RiboGreen dye (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and were used to normalize mRNA levels as described by Alós *et al.* (2006) (21). Values were the mean of at least three independent analyses. Statistical analysis was performed with the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc. 1989) to reveal significant differences between mRNA levels for each gene and at each developmental stage.

#### Cloning and sequencing *Citrus sinensis* *Lcy-b* genomic DNA and allelic diversity analysis.

Amplification of *Lcy-b* gene was performed by PCR using *Citrus sinensis* (cv. Shamouti, Sanguinelli, and Cara Cara navel) genomic DNA as template and specific primers: LCY-b2 forward 5'-ATGGATACTGTACTCAAACTCA-3' and LCY-b2 reverse 5'-TTAATCTGTATCTTGACCAAGTT-3'. This primer pair was designed on the basis of the sequences of *Lcy-b* cDNA from *C. unshiu* and *C. sinensis* (AY166796, AY094582, AF240787, AY679167, AY679168 and AY644699). PCR was performed in a total volume of 50 µL with 1X Pfx50 PCR mix (Invitrogen), 0.2 mM dNTP, 1 µM forward and reverse primers, 5 units of Pfx50 DNA polymerase, and 100 ng of template genomic DNA. The amplification procedure was as follows: 1 cycle of 94°C, 2 min; 35 cycles of 94°C, 15 s; 55°C, 30 s; 68°C, 6 min; 1 cycle of 68°C 5 min. The amplified fragments for each *C. sinensis* cultivar were separated by electrophoresis on 1 % agarose gel, purified with GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham) and cloned into the TOPO® Cloning vector using the TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. For the *Lcy-b* gene five clones per cultivar were sequenced. Sequencing was carried out by MWG BIOTECH (Germany) with the specific primers previously defined. Sequence alignments were carried out using clustal W multiple alignment procedure of Bioedit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

#### Principal component analysis (PCA)

The data matrix was composed of 4 orange varieties and 17 variables: total carotenoid content, 9 carotenoids expressed as percentage of total carotenoid area in February, and mRNA levels of 7 genes in February. PCA was performed with XLStat software (Addinsoft). The two first principal components (PC1 and PC2) represented 87.16 % of the cumulated variance.

## RESULTS

#### Diversity of carotenoid profiles within the four orange varieties.

In order to investigate the role of the expression of carotenoid biosynthetic genes in the intraspecific variability in carotenoid composition, we analyzed four colour-contrasted orange varieties (see Figure 1 and Table 2). It is important to note that Huang pi Chen produces yellow fruits (Huang pi Chen juice is characterized by a negative CIE *a*\* value, positive values corresponding to reddish colours) and that the conformity of Huang pi Chen genomes to *Citrus sinensis* genomes was verified by SSR analyses. Values of colour parameters presented in Table 2 were contrasted among the four oranges reflecting differences between the varieties. Indeed, Sanguinelli orange was characterized by the highest *a*\* value ( $32.3 \pm 0.9$ ) whereas Huang pi Chen presented the lowest value for *a*\* ( $-10.4 \pm 0.2$ ). For Cara Cara navel orange the juice colour score of *a*\* value was higher compared to that of Shamouti orange. As regards the juice colour parameter *b*\* (positive values corresponding to yellowish colours), it was interesting to note that the juice of shamouti presented the highest score ( $55.1 \pm 0.6$ ) and the juice of Sanguinelli the lowest ( $15.0 \pm 1.6$ ). Carotenoids from juices of four orange (*C. sinensis*) varieties (cv. Shamouti, sanguinelli, Cara Cara navel and Huang pi Chen) at the last developmental stage in February were analysed by HPLC. Twenty two carotenoid pigments were isolated and quantified. Their chromatographic and spectral characteristics are shown in Table 4 and Figure 2. Lutein (peak number 8), zeaxanthin (10), β-cryptoxanthin (16), α-carotene (19), β-carotene (20), and lycopene (22) were identified by coinjection with authentic standards. Other peaks (1, 5-7, 9, 11, 13-15, 17-18, 21) were tentatively identified by comparison of their chromatographic and spectral characteristics with those available in the literature obtained from the same plant material (orange juices) and under the same chromatographic conditions (*C*<sub>30</sub> column, and a mixture of water, methanol, and MTBE as eluent). Four peaks (2, 3, 4, and 12) remained unidentified. Concentrations, in mg L<sup>-1</sup>, were calculated as the mean of at least three measurements. Total content in carotenoid pigments in juices was calculated by summing the concentrations of all individual compounds (Figure 3).

Carotenoid profiles from the four orange varieties were compared (Figure 2). No qualitative differences were found between Shamouti and Sanguinelli oranges (profiles A and B on Figure 2) accumulated high levels of β,β-xanthophylls: *cis*-violaxanthin (peak n° 5, Figure 2), lutein (8), zeaxanthin (10), *cis*-antheraxanthin (11) and β-cryptoxanthin (16). β,β-xanthophylls accounted for 62.9 % and 59.5 % of total carotenoid contents in juices of Shamouti and Sanguinelli oranges respectively. *Cis*-violaxanthin and β-cryptoxanthin were the most abundant pigments in these two genotypes. Percentages of *cis*-violaxanthin were 37.4 % and 34.4 % whereas percentages of β-cryptoxanthin were 15.0 % and 10.2 %

**Table 4.** Chromatographic and spectral characteristics of carotenoids found in orange juices.

no.	RT (min±SD) <sup>a</sup>	tentative identification		$\lambda_{\max}$ (nm) observed			
				peak I	peak II	peak III	% III/II <sup>b</sup>
1	15.76±0.09	<i>cis</i> -apocarotenoid <sup>c</sup>	cis328	408	430	458	
2	16.33±0.04	unidentified	cis328	416	439	468	76
3	17.35±0.04	unidentified		399	422	448	75
4	17.96±0.05	unidentified		400	422	448	
5	18.71±0.07	<i>cis</i> -violaxanthin <sup>c</sup>	cis328	412	436	464	81
6	19.59±0.04	luteoxanthin <sup>c</sup>		396	418	443	75
7	19.92±0.04	mutatoxanthin <sup>c</sup>		404	426	448	31
8	20.57±0.09	Lutein <sup>d</sup>		422	444	472	48
9	20.78±0.06	mutatoxanthin <sup>c</sup>		407	428	451	
10	21.89±0.04	Zeaxanthin <sup>d</sup>		426	450	476	17
11	22.55±0.04	<i>cis</i> -antheraxanthin <sup>c</sup>	cis330	417	440	468	47
12	24.25±0.08	unidentified		422	446	473	44
13	25.40±0.09	<i>cis</i> - $\beta$ -cryptoxanthin <sup>c</sup>	cis338	420	444	470	
14	26.10±0.04	zeinoxanthin <sup>c</sup>		422	445	473	47
15	26.96±0.06	phytoene <sup>c</sup>		276	286	298	
16	28.16±0.08	$\beta$ -cryptoxanthin <sup>d</sup>		427	450	477	20
17	28.59±0.03	phytofluene <sup>c</sup>		331	348	368	68
18	32.25±0.09	$\zeta$ -carotene <sup>c</sup>		379	400	424	90
19	33.35±0.09	$\alpha$ -carotene <sup>d</sup>		422	444	470	34
20	35.51±0.09	$\beta$ -carotene <sup>d</sup>			452	477	12
21	45.95	<i>cis</i> -lycopene <sup>c</sup>	cis355	441	466	490	
22	55.57±0.06	Lycopene <sup>d</sup>		446	472	502	71

<sup>a</sup>RT, retention time ±SD, standard deviation. <sup>b</sup>spectral fine structure value calculated as the percentage of the quotient between band III and band II ( $\lambda_{\max}$ ) taking the trough between the two bands as the baseline. <sup>c</sup>tentative identification [Rouseff *et al.*, 1996 (41); Goodner *et al.*, 2001 (11); Rodrigo *et al.*, 2004 (28); Melendez-Martinez *et al.*, 2005 a (42) and b (43)]. <sup>d</sup>identified using authentic standards.

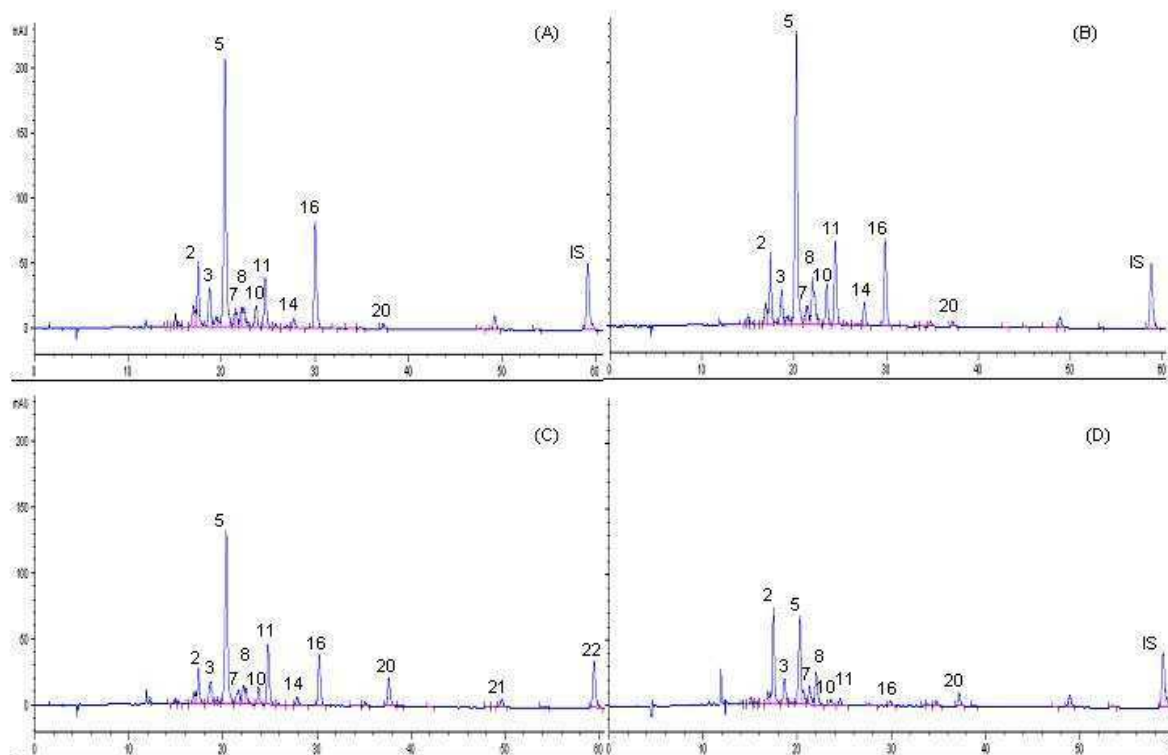
in Shamouti and Sanguinelli oranges respectively. These results indicate that the difference in colour among both varieties (see **Table 2**) is mostly due to the presence of anthocyanins, since the carotenoid composition is practically identical in Shamouti and Sanguinelli. Carotenoid composition of Cara Cara navel and Huang pi Chen oranges were different to that of Shamouti and Sanguinelli oranges (see profile C and D **Figure 2**). Cara Cara navel orange accumulated two pigments: *cis*-lycopene (21) and all-*trans*-lycopene (22) which were not detected in the other varieties. Some carotenoid pigments were undetected or detected as traces in juices of Huang pi Chen orange (for example peaks with numbers 10, 11, 14 and 16 on **Figure 2**). Cara Cara navel and Huang pi Chen oranges accumulated lower amounts of  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylls than Shamouti and Sanguinelli oranges.  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylls represented 25.7 % and 25.1 % of total carotenoids in juices of Cara Cara navel and Huang pi Chen oranges respectively. Cara Cara navel orange accumulated large amounts of linear carotenes. In this orange, the main carotenoids were phytoene and *cis*-violaxanthin. The percentage of phytoene was 37.5 % of total carotenoids whereas *cis*-violaxanthin represented 15.1 % of total carotenoids. *Cis*-violaxanthin,  $\zeta$ -carotene, and phytoene were the main pigments in Huang pi Chen orange. The proportions of these carotenoids were 20.6 %, 9.1 % and 8.5 % respectively. Quantitative differences were also found. It is important to notice that total carotenoid contents in Shamouti, Sanguinelli and Cara cara navel oranges were much higher than in Huang pi Chen orange (see **Figure 3**). Indeed, total carotenoid contents in these genotypes were 23.40, 33.03, 47.41, and 2.51 mg L<sup>-1</sup> respectively. Consequently, *cis*-violaxanthin

which was the main carotenoid in Huang pi Chen orange reached 0.52 mg L<sup>-1</sup> in this genotype whereas contents were 8.90, 11.52 and 7.35 mg L<sup>-1</sup> in Shamouti, Sanguinelli and Cara Cara navel oranges respectively.

#### Transcript levels of seven genes in juice sacs of four orange varieties at three maturation stages

The expression of seven genes (*Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, and *Zep*) involved in the MEP and carotenoid pathways were analyzed in juice sacs of four orange varieties by real-time RT-PCR. Primer pairs were defined with primer 3 software using coding sequences from *Citrus* fruits available in public databanks (**Table 3**). The expression of these genes was studied at three maturation stages (in August (A), in November (N), and in February (F) see **Figure 4**). Expression values were the mean of at least three measurements. Statistical analyses were performed to reveal significant differences between the four orange varieties.

Two different expression patterns were distinguished. The first one concerned the expression profiles of *Dxs* and *Psy* genes that were very similar. *Dxs* and *Psy* genes which are involved in the biosynthesis of phytoene, the first carotenoid of the biosynthetic pathway, presented a continuous increase in expression during fruit maturation for the four genotypes. *Dxs* and *Psy* transcripts reached the highest levels at the last developmental stage in February: the transcripts increased 6 to 20 fold and 3 to 6 fold for *Dxs* and *Psy* genes respectively from August to February. Interestingly, a significant difference was found between the four genotypes in February. Transcript levels in February for both *Dxs* and *Psy* genes were much lower



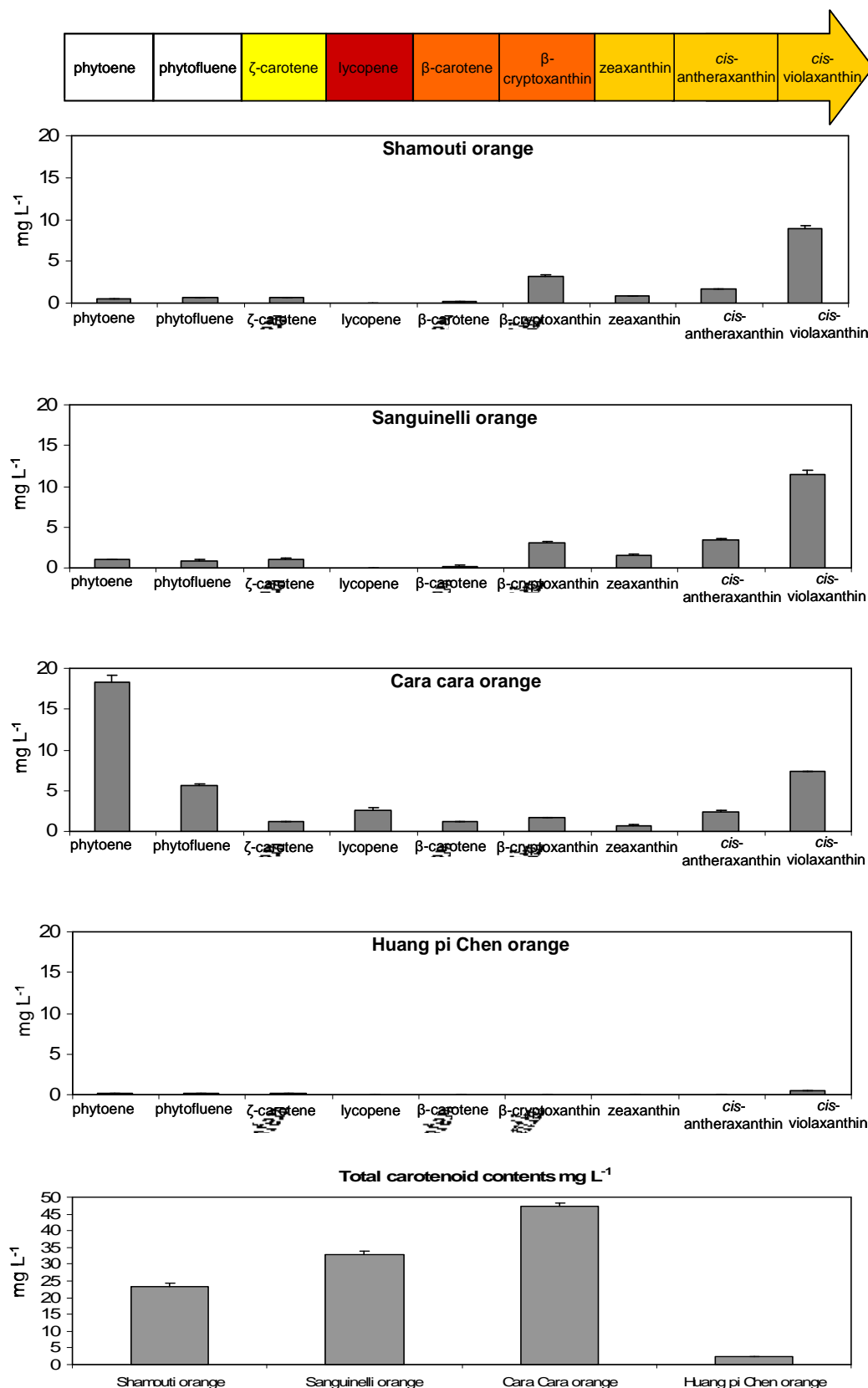
**Figure 2.** Chromatograms at 450 nm of carotenoids from juices of four orange varieties (A, Shamouti ; B, Sanguinelli ; C, Cara Cara navel ; D, Huang pi Chen). Tentative peak identification is presented in **Table 4**. IS, internal standard.  $\beta$ -apo-8'-carotenal and lycopene were used as internal standard in non-saponified (chromatograms not shown) and saponified extracts respectively. For Cara Cara navel orange, no internal standard was used in saponified extract. Note that the extracts for Huang pi Chen orange were not diluted before injection.

in juice sacs of Huang pi Chen orange when compared to the other oranges.

The second expression pattern concerned the expression profiles of *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* and *Zep* genes. In Cara Cara navel and Huang pi Chen oranges, transcript levels of these five genes increased in juice sacs until November except for the *Lcy-b* gene and Huang pi Chen orange. Indeed, *Lcy-b* transcript levels did not change significantly in juice sacs of Huang pi Chen orange during maturation. *Pds*, *Zds*, *Hy-b* and *Zep* transcripts increased 2 to 9 fold from August to November in Cara Cara navel and Huang pi Chen oranges. In juice sacs of Shamouti and Sanguinelli oranges, the increase in *Pds*, *Zds*, *Hy-b* and *Zep* expression continued from November to February. Consequently, *Pds*, *Zds*, *Hy-b* and *Zep* transcripts increased 2 to 10 fold from August to February in Shamouti and Sanguinelli oranges.

Principal component analysis (PCA) was performed to examine the relationship between carotenoid composition and the expression levels of these genes. The data matrix was composed of 4 orange varieties and 17 variables: total carotenoid content, 9 carotenoids expressed as percentage of total carotenoid area in February, and mRNA levels of 7 genes in February. The results from the analysis are presented in **Figure 5** with the correlation matrix in **Table 5**. Highly positive correlations were found between carotenoid variables: between phytoene (b) and phytofluene (c) and lycopene (e) ( $r = 0.969$  and  $0.985$  respectively), between phytofluene (c) and lycopene (e) ( $r = 0.914$ ), between  $\beta$ -cryptoxanthin (g) and

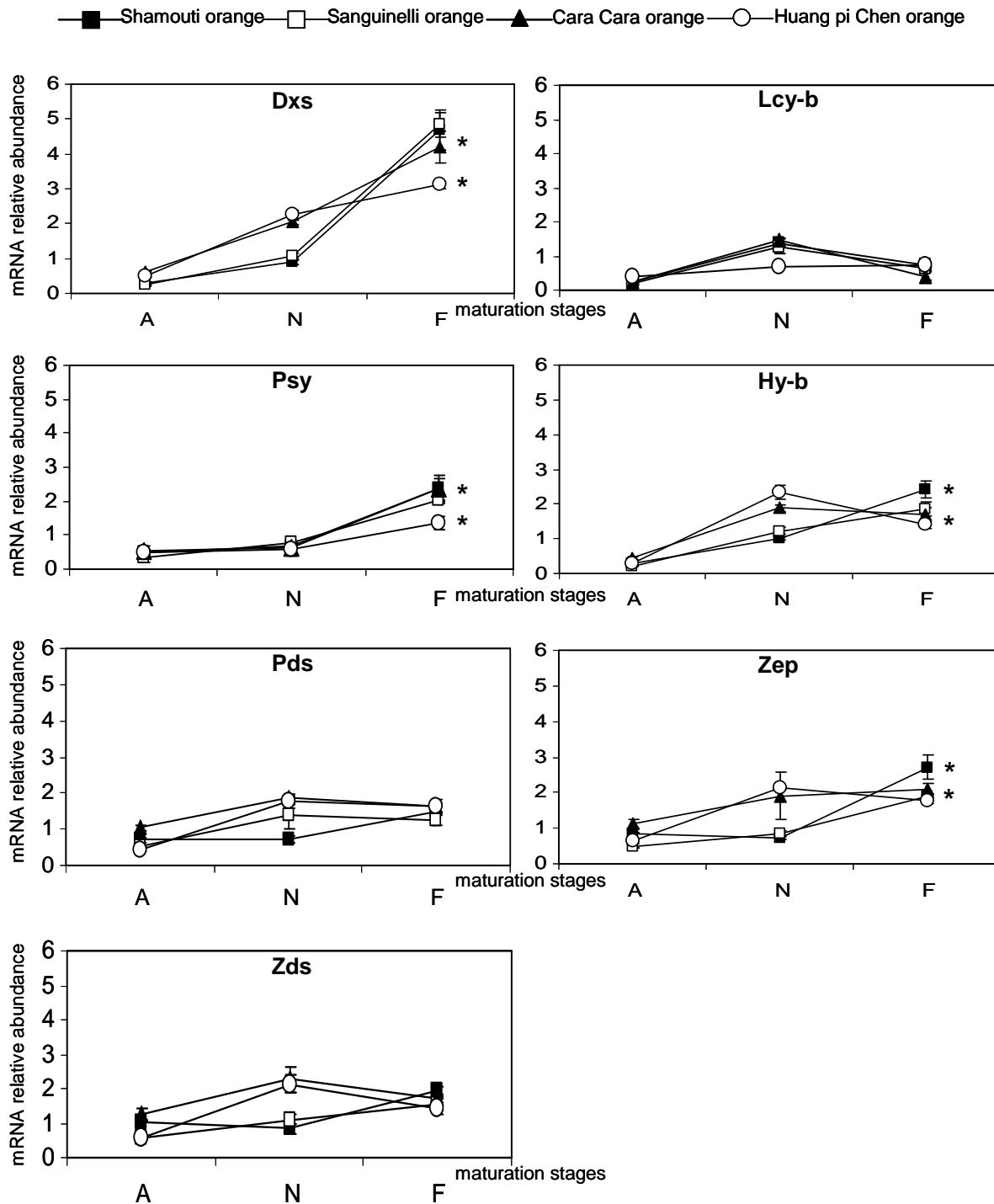
*cis*-violaxanthin (j) ( $r = 0.905$ ), and between zeaxanthin (h) and *cis*-antheraxanthin (i) and *cis*-violaxanthin (j) ( $r = 0.938$  and  $0.852$  respectively). Negative correlations were also found: between total carotenoid content (a) and  $\zeta$ -carotene (d) ( $r = -0.860$ ), between  $\beta$ -carotene (f) and  $\beta$ -cryptoxanthin (g), zeaxanthin (h), *cis*-antheraxanthin (i), and *cis*-violaxanthin (j), ( $r = -0.936$ ,  $-0.916$ ,  $-0.941$ , and  $-0.821$  respectively), and between *cis*-violaxanthin (j) and phytoene (b) and phytofluene (c) ( $r = -0.836$ , and  $-0.943$  respectively). It is interesting to note that highly positive or negative correlations were found between carotenoids and mRNA levels of some genes. *Dxs* (k) was positively correlated with  $\beta$ -cryptoxanthin (g), zeaxanthin (h), and *cis*-antheraxanthin (i) ( $r = 0.839$ ,  $0.808$ , and  $0.947$  respectively) and was negatively correlated with  $\zeta$ -carotene (d), and  $\beta$ -carotene (f) ( $r = -0.907$  and  $-0.941$  respectively). *Psy* (l) was positively correlated with total carotenoid content (a) ( $r = 0.837$ ) and negatively correlated with  $\zeta$ -carotene (d) ( $r = -0.975$ ). *Pds* (m) was negatively correlated with zeaxanthin (h) and *cis*-antheraxanthin (i) ( $r = -0.970$  and  $-0.873$  respectively). *Lcy-b* (o) was negatively correlated with total carotenoid content (a), phytoene (b) and lycopene (e) ( $r = -0.888$ ,  $-0.889$ , and  $-0.945$  respectively). *Hy-b* (p) was positively correlated with  $\beta$ -cryptoxanthin (g) ( $r = 0.956$ ) and negatively correlated with  $\beta$ -carotene (f) ( $r = -0.821$ ). Only positive correlations were found between mRNA levels of some genes. *Dxs* (k) was correlated with *Psy* (l) ( $r = 0.809$ ). *Psy* (l) and *Pds* (m) were correlated ( $r = 0.842$ ). *Zds* (n) was correlated with *Hy-b* (p) and *Zep* (q) ( $r = 0.927$  and  $0.971$  respectively) whereas *Hy-b* (p) was also correlated with *Zep* (q) ( $r = 0.918$ ). The



**Figure 3.** Carotenoid contents in the juice sacs of four orange varieties, Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel and Huang pi Chen orange at the development stage III. Contents are expressed in mg L<sup>-1</sup>, values are means  $\pm$  SD of at least three measurements. The values for total carotenoid contents were the sum of all carotenoids characterized by HPLC analysis and quantified with calibration curves and expressed in mg L<sup>-1</sup>. For  $\beta$ -cryptoxanthin the limit of detection (LOD) is 0.0046  $\mu$ g and the limit of quantification (LOQ) 0.0152  $\mu$ g.

differentiation between Shamouti, Sanguinelli and Cara Cara navel, Huang pi Chen orange was shown on the PC1 axis (**Figure 5**). It was explained by higher percentages of  $\beta,\beta$ -xanthophylls and higher *Hy-b* and *Dxs* mRNA levels in February in Shamouti and Sanguinelli

than in Cara Cara navel and Huang pi chen oranges. Differentiation of Cara Cara navel and Huang pi chen orange was effective on PC2 axis and can be explained by higher total carotenoid content and higher percentages



**Figure 4.** mRNA levels of *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, and *Zep* in juice sacs of four orange varieties, Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel, and Huang pi Chen orange at three maturation stages, A, August; N, November and F, February. Expression profiles were determined by real-time RT-PCR. Arbitrary units were assigned to mRNA level scales. Data are means  $\pm$  SD of three measurements. Asterisks indicate statistically significant differences in mRNA levels between genotypes ( $P < 0.01$  for *Dxs* and *Psy* genes and  $P < 0.05$  for *Hy-b* and *Zep* genes).

of phytoene and lycopene in Cara Cara navel orange than in Huang pi Chen orange.

#### Cloning and sequence analysis of *Lcy-b* gene from Cara Cara navel, Shamouti and Sanguinelli oranges.

In order to elucidate the relationship between the accumulation of lycopene in juice sacs of Cara Cara navel orange and the allelic variability of *Lcy-b* gene, we isolated *Lcy-b* alleles from Cara Cara navel, Shamouti and Sanguinelli oranges, PCR amplifications were

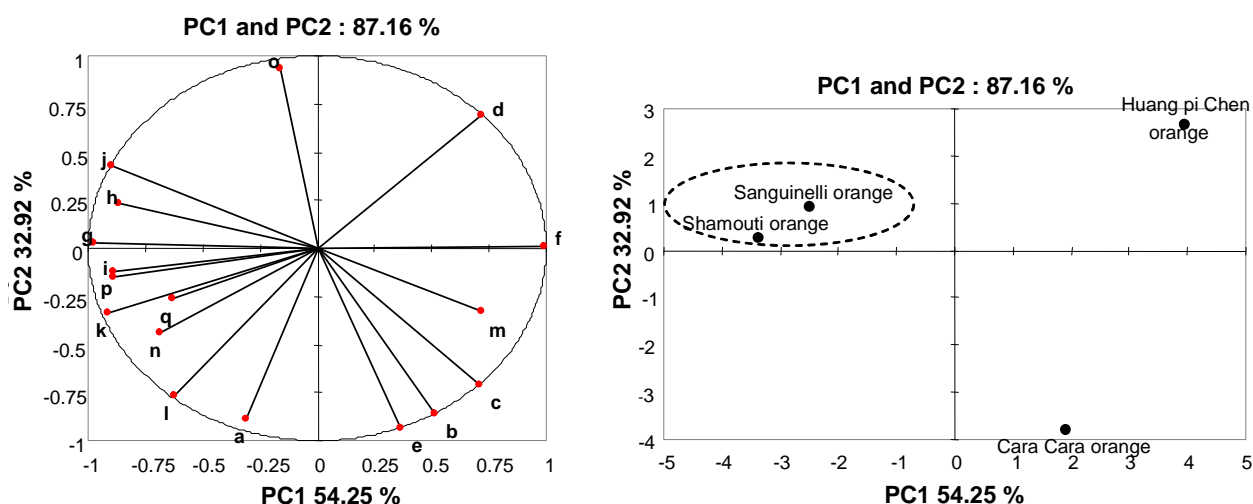
performed with genomic DNA from these three varieties as template. After purification, PCR products were cloned into the TOPO® Cloning vector and five clones per genotype were sequenced [*Lcy-b* is a single copy gene in the *Citrus* genome according to Fanciullino *et al.* (44)]. The *Lcy-b* clones were 1515 pb in length. These genomic sequences were compared to *Lcy-b* cDNA sequences and no introns were found. Moreover, two alleles were isolated from each genotype. The genomic sequences of *Lcyb1* and *Lcyb2* from Cara Cara navel



Table 5. Correlation matrix in PCA

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q
a	1	0.622	0.414	-0.860	0.737	-0.361	0.200	0.206	0.527	-0.130	0.654	<b>0.837</b>	-0.136	0.412	<b>-0.888</b>	0.261	0.184
b	0.622	1	<b>0.969</b>	-0.227	<b>0.985</b>	0.492	-0.541	-0.622	-0.332	<b>-0.836</b>	-0.171	0.330	0.615	-0.007	<b>-0.899</b>	-0.352	-0.142
c	0.414	<b>0.969</b>	1	0.018	<b>0.914</b>	0.691	-0.714	-0.774	-0.541	<b>-0.943</b>	-0.408	0.101	0.733	-0.179	-0.777	-0.526	-0.270
d	-0.860	-0.227	0.018	1	-0.389	0.728	-0.665	-0.489	-0.748	-0.342	<b>-0.907</b>	<b>-0.975</b>	0.331	-0.761	0.550	-0.712	-0.587
e	0.737	<b>0.985</b>	<b>0.914</b>	-0.389	1	0.340	-0.394	-0.506	-0.186	-0.731	-0.004	0.484	0.528	0.130	<b>-0.945</b>	-0.206	-0.027
f	-0.361	0.492	0.691	0.728	0.340	1	<b>-0.936</b>	<b>-0.916</b>	<b>-0.941</b>	-0.877	<b>-0.941</b>	-0.612	0.792	-0.607	-0.107	<b>-0.821</b>	-0.530
g	0.200	-0.541	-0.714	-0.665	-0.394	<b>-0.936</b>	1	0.757	0.765	<b>0.905</b>	<b>0.839</b>	0.613	-0.578	0.782	0.259	<b>0.956</b>	0.768
h	0.206	-0.622	-0.774	-0.489	-0.506	<b>-0.916</b>	0.757	1	<b>0.938</b>	0.852	0.808	0.307	<b>-0.970</b>	0.237	0.216	0.541	0.165
i	0.527	-0.332	-0.541	-0.748	-0.186	<b>-0.941</b>	0.765	<b>0.938</b>	1	0.718	<b>0.947</b>	0.590	-0.873	0.404	-0.109	0.610	0.267
j	-0.130	<b>-0.836</b>	<b>-0.943</b>	-0.342	-0.731	-0.877	<b>0.905</b>	0.852	0.718	1	0.665	0.237	-0.747	0.464	0.571	0.761	0.503
k	0.654	-0.171	-0.408	<b>-0.907</b>	-0.004	<b>-0.941</b>	<b>0.839</b>	0.808	<b>0.947</b>	0.665	1	<b>0.809</b>	-0.677	0.660	-0.233	0.774	0.517
l	<b>0.837</b>	0.330	0.101	<b>-0.975</b>	0.484	-0.612	0.613	0.307	0.590	0.237	<b>0.809</b>	1	-0.122	<b>0.842</b>	-0.575	0.725	0.688
m	-0.136	0.615	0.733	0.331	0.528	0.792	-0.578	<b>-0.970</b>	-0.873	-0.747	-0.677	-0.122	1	0.005	-0.222	-0.321	0.078
n	0.412	-0.007	-0.179	-0.761	0.130	-0.607	0.782	0.237	0.404	0.464	0.660	<b>0.842</b>	0.005	1	-0.113	<b>0.927</b>	<b>0.971</b>
o	<b>-0.888</b>	<b>-0.899</b>	-0.777	0.550	<b>-0.945</b>	-0.107	0.259	0.216	-0.109	0.571	-0.233	-0.575	-0.222	-0.113	1	0.147	0.096
p	0.261	-0.352	-0.526	-0.712	-0.206	<b>-0.821</b>	<b>0.956</b>	0.541	0.610	0.761	0.774	0.725	-0.321	<b>0.927</b>	0.147	1	<b>0.918</b>
q	0.184	-0.142	-0.270	-0.587	-0.027	-0.530	0.768	0.165	0.267	0.503	0.517	0.688	0.078	<b>0.971</b>	0.096	<b>0.918</b>	1

(a) total carotenoid contents, (b) phytoene, (c) phytofluene, (d)  $\zeta$ -carotene, (e) lycopene, (f)  $\beta$ -carotene, (g)  $\beta$ -cryptoxanthin, (h) zeaxanthin, (i) cis-antheraxanthin, (j) cis-violaxanthin, (k) DXS, (l) PSY, (m) PDS, (n) ZDS, (o) LCY-b, (p) HY-b, (q) ZEP.



**Figure 5.** Orange varieties differentiation by PCA using carotenoids (expressed as percentage of total carotenoid area in February) and mRNA levels of seven genes in February. (a) total carotenoid content, (b) phytoene, (c) phytofluene, (d)  $\zeta$ -carotene, (e) lycopene, (f)  $\beta$ -carotene, (g)  $\beta$ -cryptoxanthin, (h) zeaxanthin, (i) cis-antheraxanthin, (j) cis-violaxanthin, (k) *Dxs*, (l) *Psy*, (m) *Pds*, (n) *Zds*, (o) *Lcy-b*, (p) *Hy-b*, (q) *Zep*. The two first principal components (PC1 and PC2) represented 87.16 % of the cumulated variance divided in 54.25 % for PC1 loaded with  $\beta$ -carotene (f),  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylls (g, h, i, j), *Dxs* (k), and *Hy-b* (p), 32.92 % for PC2 loaded with total carotenoid content (a), phytoene (b), lycopene (e) and *Lcy-b* (o). Shamouti and Sanguinelli oranges are classified in the same cluster and are different from the two other oranges by high percentages of  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylls (g, h, i, j). Huang pi Chen orange is differentiated from the other genotypes by low total carotenoid content (a) and low mRNA levels of *Dxs* (k) and *Psy* (l) whereas Cara Cara orange is separated from the other oranges by high percentages of lycopene (e) and phytoene (b).

orange were different in 14 nucleotides, resulting in 3 amino acid changes. These two alleles (*Lcyb1* and *Lcyb2*) were also present in Sanguinelli and Shamouti oranges (data not shown) and in Bonanza orange (GenBank accession number DQ496221 and DQ496222).

## DISCUSSION

**Regulation of biosynthetic genes at the transcriptional level and relationships with carotenoid composition in oranges.**

This study attempted to evaluate the roles of the expression of seven genes in the carotenoid composition of four orange varieties. The coordination of the MEP and carotenoid pathways was also investigated. Total carotenoid content in the four oranges was in agreement with the expression levels of *Dxs* and *Psy* in February. Moreover, transcript levels of *Dxs* and *Psy* were positively correlated (Figure 5). These findings suggest that in juice sacs, the expression of *Dxs* and *Psy* genes is coordinated and this plays an important



role in carotenoid accumulation. These results are in agreement with those of Lois *et al.* (19) on tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits, demonstrating that coordinated expression of these two genes controlled carotenoid synthesis. In *Citrus* fruits, the expression patterns of *Dxs* in juice sacs and flavedo are different since *Dxs* mRNA levels in the peel decrease with the degreening of fruits (21). A possible explanation for this difference, could be a competition for GGPP between carotenoid and chlorophyll biosynthetic pathways in flavedo. The decrease in *Dxs* transcripts and the increase in *Psy* transcripts would allow a prevalence of carotenoid synthesis over chlorophyll. In juice sacs, very low amounts of chlorophylls are synthesized. This fact can explain the coordinated expression of *Dxs* and *Psy* genes. It is worth to mention that in juice sacs of Huang pi Chen orange *Dxs* and *Psy* expression was relatively lower than in the other varieties although this observation by itself does not appear to explain the practically absence of carotenoids in this variety. The carotenoid cleavage dioxygenase genes would not play an important role since the percentage of *cis*-violaxanthin in Huang pi Chen juices was high (20.6 %) (24). However, ABA levels in this variety should be determined to confirm this hypothesis.

In juice sacs of Shamouti and Sanguinelli oranges, the accumulation of  $\beta,\beta$ -xanthophylls was associated with the increase in the expression of carotenoid biosynthetic genes, and especially with the up-regulation of the *Hy-b* gene. Indeed, high transcript levels of *Hy-b* gene in February were correlated with high percentages of  $\beta$ -cryptoxanthin. The *Hy-b* transcripts increased 9 fold in Shamouti orange and 10 fold in Sanguinelli orange from August to February. According to Kato *et al.* (9), the  $\beta,\beta$ -xanthophyll accumulation in juice sacs of Satsuma mandarin and Valencia orange was due to a simultaneous increase in the expression of genes *CitPsy*, *CitPds*, *CitZds*, *CitLcyb*, *CitHyb* and *CitZep*. Our results are in agreement with those of Kato *et al.* (9) for Shamouti and Sanguinelli cultivars which are characterized by the highest percentages of  $\beta,\beta$ -xanthophylls. The presence of anthocyanins in juice sacs of Sanguinelli orange should be responsible for the higher CIE  $a^*$  value (redness) compared to that of Shamouti juices (1).

Surprisingly, in Cara Cara orange, no significant difference was found in the transcript levels of *Pds*, *Zds*, *Lcy-b* genes in February when compared to Shamouti and Sanguinelli oranges. It was expected that the accumulation of carotenes could be related to down-regulation of the expression of these genes and especially by a down-regulation of *Lcy-b* expression. In addition, the Cara Cara navel orange phenotype could not be explained by mutations in the coding sequence of the *Lcy-b* gene. Indeed, the two alleles isolated from this genotype were also those of other oranges which did not accumulate lycopene. The large amount of phytoene in juice sacs of Cara Cara navel orange was not due to a higher expression of *Dxs* and *Psy* genes when compared to Shamouti and Sanguinelli oranges. These results are in agreement with those of Tao *et al.* (45). These authors showed that in juice sacs of Cara Cara and Washington oranges, no remarkable difference for *Psy* expression was observed, while phytoene exclusively accumulated in Cara Cara. Other regulation mechanisms should be involved such as post-transcriptional regulations, catalytic activity of enzyme or plastid import of enzyme.

According to Inoue *et al.* (46), LCY-b was synthesized as a precursor of about 60 kDa, targeted both to the soluble and to the membrane fractions of plastids and was processed into a mature form of 45 kDa. These mechanisms could play a role in enzyme activation. Another explanation could be that the turnover of the carotenogenic enzymes would depend on the orange varieties leading to contrasted activities of the enzymes and differential compound accumulation. The two enzymes (PDS and ZDS) needed plastoquinones and a plastid terminal oxidase as electron acceptor to catalyze desaturation reactions (3, 15). So, Cara Cara navel orange phenotype could also be explained by a default in these cofactors. A similar situation has been found in Pinalate, a navel orange mutant which produces yellow mature fruits (47). Pinalate flavedo was characterized by an unusual accumulation of linear carotenes (phytoene, phytofluene and  $\zeta$ -carotene) and lower ABA contents than in the corresponding tissues of the parental variety Navelate. The authors suggested that an alteration in  $\zeta$ -carotene desaturase or in  $\zeta$ -carotene desaturase-associated factors is responsible for the Pinalate phenotype.

In conclusion, the results presented in this work revealed a general pattern of transcript change in juice sacs of citrus fruit, characterized by an apparent coordination of *Dxs* and *Psy* expression and a general increase in mRNA levels of carotenoid biosynthetic genes. These transcript changes correlated well with the  $\beta,\beta$ -xanthophyll accumulation, the normal carotenoid set, observed in Shamouti and Sanguinelli oranges. The data also suggest that the preferential accumulation of linear carotenes in Cara Cara navel and the practically absence of carotenoids in Huang pi Chen oranges were not predominantly due to changes in the regulation of carotenoid biosynthetic genes at the transcriptional level.

## ABBREVIATIONS USED

GGPP, geranylgeranyl diphosphate. HY-b,  $\beta$ -carotene hydroxylase. HY-e,  $\epsilon$ -carotene hydroxylase. LCY-b, lycopene  $\beta$ -cyclase. LCY-e, lycopene  $\epsilon$ -cyclase. MEP pathway, methyerythritol phosphate pathway. PDS, phytoene desaturase. PSY, phytoene synthase. RFLP, restriction fragment length polymorphism. SSR, simple sequence repeats. ZDS,  $\zeta$ -carotene desaturase. ZEP, zeaxanthin epoxidase.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Collectivité Territoriale de Corse for granting this study. I. Sanchis is gratefully acknowledged for her help during this work. We thank C. Jacquemond and F. Curk (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for their assistance and for helpful discussions.

## LITERATURE CITED

- (1) Lee, S. H. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed Budd Blood orange (*C. sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1243-1246.
- (2) Olsen, J. A. Provitamin A function of carotenoid. The conversion of beta-carotene into vitamin A. *J. Nutr.* 1989, 119, 105-108.
- (3) Fraser, P. D.; Bramley, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 2004, 43, 228-265.

- (4) Garner, P. T.; White, T. A. C.; McPhail, D. B.; Duthie, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* 2000, 68, 471-474.
- (5) Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, P.; Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 430-439.
- (6) Riso, P.; Visioli, F.; Gardana, C.; Grande, S.; Brusamolino, A.; Galvano, F.; Galvano, G.; Porrini, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 941-947.
- (7) Yano, M. Cancer prevention by Citrus. *J. Jpn. Soc. Food Sci. chem.* 1999, 47, 128-135.
- (8) Wu, K.; Erdman, J. W. Jr.; Schwartz, S. J.; Platz, E. A.; Leitzmann, M.; Clinton, S. K.; DeGroot, V.; Willett, W. C.; Giovannucci, E. Plasma and dietary carotenoids, and the risk of prostate cancer: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004, 13(2), 260-269.
- (9) Kato, M.; Ikoma, Y.; Matsumoto, H.; Sugiura, M.; Hyodo, H.; Yano, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 2004, 134, 1-14.
- (10) Fanciullino, A. L.; Dhuique-Mayer, C.; Luro, F.; Casanova, J.; Morillon, R.; Ollitrault, P. Carotenoid diversity in cultivated Citrus is highly influenced by genetic factors. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4397-4406.
- (11) Goodner, K. L.; Rouseff, R. L.; Hofsommer, H. J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1146-1150.
- (12) Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M.-J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2140-2145.
- (13) Lee, H. S.; Castle, W. S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 877-882.
- (14) Lee, H. S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2563-2568.
- (15) Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001, 4, 210-218.
- (16) Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 385, 4-12.
- (17) Lichtenthaler, H. K. The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999, 50, 47-65.
- (18) Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 2002, 130, 1079-1089.
- (19) Lois, L. M.; Rodriguez-Concepcion, M.; Gallego, F.; Campos, N.; Boronat, A. Carotenoid biosynthesis during fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* 2000, 22 (6), 503-513.
- (20) Botella-Pavia, P.; Besumbes, O.; Phillips, M. A.; Carretero-Paulet, L.; Boronat, A.; Rodriguez-concepcion, M. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* 2004, 40, 188-199.
- (21) Alos, E.; Cercos, M.; Rodrigo, M.J.; Zacarias L.; Talon, M. Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. *J. Agri. Food Chem.* 2006, 54, 4888-4895.
- (22) Cunningham, F. X.; Pogson, B.; Sun, Z.; McDonald, K.A.; DellaPenna, D.; Gantt, E. Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell.* 1996, 8, 1613-1626.
- (23) Ronen, G.; Cohen, M.; Zamir, D.; Hirschberg, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during and is elevated in the mutant delta. *Plant J.* 1999, 17, 341-351.
- (24) Kato, M.; Matsumoto, H.; Ikoma, Y.; Okuda, H.; Yano, M. The role of carotenoid cleavage dioxygenase in the regulation of carotenoid profiles during maturation in Citrus fruit. *Journal of Experimental Botany.* 2006, 57, 2153-2164.
- (25) Fraser, P. D.; Truesdale, M. R.; Bird, C. R.; Schuch, W.; Bramley, P. M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant J.* 1994, 105, 405-413.
- (26) Bramley, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 2002, 53 (377), 2107-2114.
- (27) Marty, I.; Bureau, S.; Sarkissian, G.; Gouble, B.; Audergon, J. M.; Albagnac, G. Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *J. Exp. Bot.* 2005, 56 (417), 1877-1886.
- (28) Rodrigo, M.-J.; Marcos, J. F.; Zacarias, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6724-6731.
- (29) Ikoma, Y.; Komatsu, A.; Kita, M.; Ogawa, K.; Omura, M.; Yano, M.; Moriguchi, T. Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* 2001, 111, 232-238.
- (30) Kita, M.; Komatsu, A.; Omura, M.; Yano, M. Cloning and expression of CitPDS1, a gene encoding phytoene desaturase in Citrus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001, 65 (6), 1424-1428.
- (31) Kim, I.-J.; Ko, K.-C.; Kim, C.-S.; Chung, W.-I. Isolation and characterization of cDNA encoding  $\beta$ -carotene hydroxylase in Citrus. *Plant Sci.* 2001, 161, 1005-1010.

- (32) Bain, J. M. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Aust. J. Bot.*, 1958, 6, 1-24.
- (33) Froelicher, Y.; Dambier, D.; Bassene, J. B.; Costantino, G.; Lotfy, S.; Didout, C.; Beaumont, V.; Brottier, P.; Risterucci, A. M.; Luro, F.; Ollitrault, P. Characterisation of microsatellite markers in mandarins (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol. Ecol. Notes*. Accepted under conditions.
- (34) Cheng, Y.; De Vicente, M. C.; Meng, H.; Guo, W.; Tao, N.; Deng, X. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiol.* 2005, 25, 661-672.
- (35) Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin* **1987**, 19, 11-15.
- (36) Samson, J. A.; Citrus. In *Tropical fruits*, second edition; Longman Group UK. Ltd., Essex, UK, 1986; 73-138.
- (37) Davies, F. S.; Albrigo, L. G. Citrus. In *Crop production science in horticulture*, CAB INTERNATIONAL; Wallingford, UK, 1994; 202-254.
- (38) CIE Recommendations on Uniform Color Spaces. Color-Difference Equations. Psychometric Color Terms. CIE, Viena, Austria. 1971, CIE publication No. 15 (E-1.3.1).
- (39) Manning, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.* 1991, 195, 45-50.
- (40) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- (41) Rouseff, R.; Raley, L. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2176-2181.
- (42) Melendez-Martinez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Identification of zeinoxanthin in orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 6362-6367.
- (43) Melendez-Martinez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Identification of isolutein (lutein epoxide) as cis-antheraxanthin in orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 9369-9373.
- (44) Fanciullino, A. L.; Dhuique-Mayer, C.; Luro, F.; Morillon, R.; Ollitrault, P. Phylogenetic diversity of seven genes of the carotenoid biosynthetic pathway in the *Citrus* genus; a variability factor influencing the carotenoid composition of juice? *J. Agric. Food Chem.* Submitted.
- (45) Tao, N.; Hu, Z.; Liu, Q.; Xu, J.; Cheng, Y.; Guo, L.; Guo, W.; Deng, X. Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep.* 2007, DOI 10.1007/s00299-006-0289-0.
- (46) Inoue, K.; Furbee, K. J.; Uratsu, S.; Kato, M.; Dandekar, A. M.; Ikoma, Y. Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. *Physiol. Plant.* 2006, 127 (4), 561-570.
- (47) Rodrigo, M. J.; Marcos, J. F.; Alferez, F.; Mallent, M. D.; Zacarias, L. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J. Exp. Bot.* 2003, 383, 727-738.

### **III.3.2. Diversité allélique du gène *Lcy-b* chez quatre variétés d'orange**

#### **III.3.2.1. Introduction**

L'orange Cara Cara navel (*C. sinensis*), mutant de l'orange Washington navel, présente une coloration particulière due à l'accumulation du lycopène de couleur rouge ( $2,26 \pm 0,50$  mg.L<sup>-1</sup>) en plus de la *cis*-violaxanthine jaune ( $5,47 \pm 0,65$  mg.L<sup>-1</sup>) et de la  $\beta$ -cryptoxanthine orange ( $1,70 \pm 0,33$  mg.L<sup>-1</sup>). Les sacs à jus de cette orange sont aussi caractérisés par de fortes concentrations en carotènes incolores : en phytoène ( $13,06 \pm 1,11$  mg.L<sup>-1</sup>) et phytofluène ( $5,06 \pm 0,30$  mg.L<sup>-1</sup>). L'orange Cara Cara navel se distingue ainsi des autres oranges qui accumulent principalement des xanthophylles : *cis*-violaxanthine,  $\beta$ -cryptoxanthine, lutéine et qui ne présentent pas de lycopène (GOODNER *et al.* 2001 ; LEE et CASTLE 2001 ; DHUIQUE-MAYER *et al.*, 2005). Cependant les mécanismes de régulation de la biosynthèse des caroténoïdes à l'origine de ce phénotype, unique chez les oranges, ne sont pas encore élucidés. L'orange Huang pi Chen est pour sa part caractérisée par de faibles teneurs globales en caroténoïdes et une accumulation préférentielle de carotènes.

Nous avons analysé l'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b*, *Zep* dans les sacs à jus des quatre oranges (cultivars Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel et Huang pi Chen) au cours de la maturation des fruits. Nos résultats suggèrent que l'accumulation du lycopène dans les sacs à jus de l'orange Cara Cara navel n'est pas liée au niveau d'expression du gène *Lcy-b* : les quantités d'ARNm du gène *Lcy-b*, mesurées à trois stades de développement des fruits, ne sont pas significativement différentes dans les sacs à jus des trois oranges Shamouti, Sanguinelli et Cara Cara navel. De plus les quantités de transcrits des gènes *Dxs* et *Psy* dans les sacs à jus de l'orange Cara Cara navel ne sont pas non plus supérieures aux quantités mesurées dans les sacs à jus des oranges Shamouti et Sanguinelli ; une surexpression de ces deux gènes aurait pu expliquer l'accumulation des carotènes. Ces résultats sont en accord avec ceux de TAO *et al.* (2007) qui ont montré que le niveau d'expression du gène *Psy* dans la pulpe de l'orange Cara Cara est comparable au niveau d'expression mesuré dans la pulpe de l'orange Washington navel.

Par ailleurs, les analyses RFLP ont montré que le gène *Lcy-b* est monolocus dans le génome des espèces du genre *Citrus*. Sur la base de ces mêmes analyses nous avons proposé que le fragment chromosomique porteur du gène *Lcy-b* est à l'état hétérozygote avec un allèle

de pamplemousse et un allèle de mandarine. L'origine phylogénétique des deux allèles du gène *Lcy-b* chez les orangers a été confirmée par les résultats des analyses DHPLC. Nous n'avons pas détecté de polymorphisme entre les quatre oranges étudiées pour le gène *Lcy-b* avec les marqueurs RFLP et SSR tandis que les analyses DHPLC montrent des variations dans la séquence du gène *Lcy-b* de l'orange Huang pi Chen par rapport aux trois autres oranges qui paraissent identiques pour ce gène.

L'objectif de cette étude est de compléter ces résultats en étudiant la diversité allélique du gène *Lcy-b* chez les quatre oranges caractérisées précédemment en clonant et séquençant les deux allèles potentiels pour chaque variété.

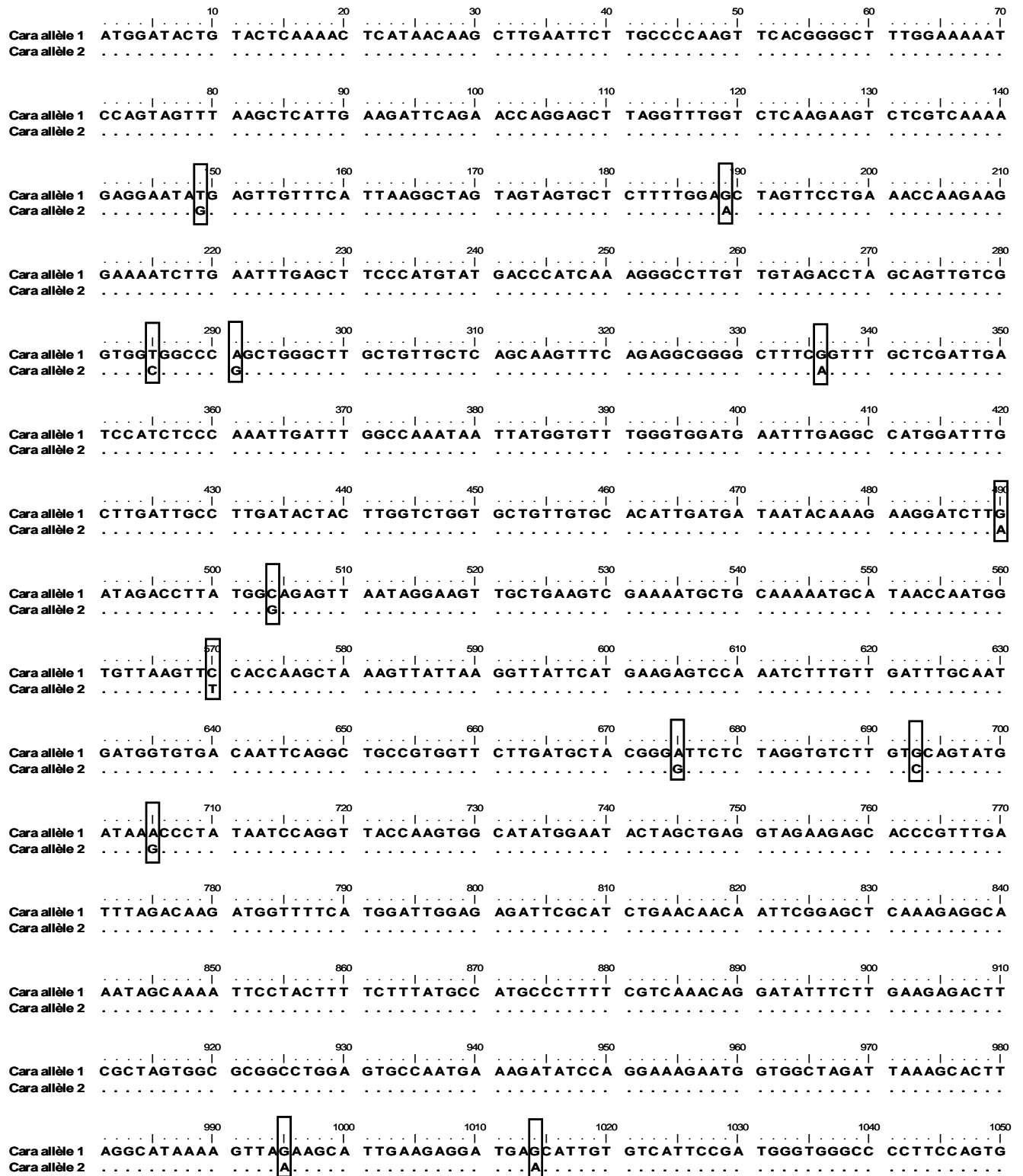
### **III.3.2.2. Résultats et Discussion**

#### **III.3.2.2.1. Clonage et séquençage du gène *Lcy-b* chez quatre oranges**

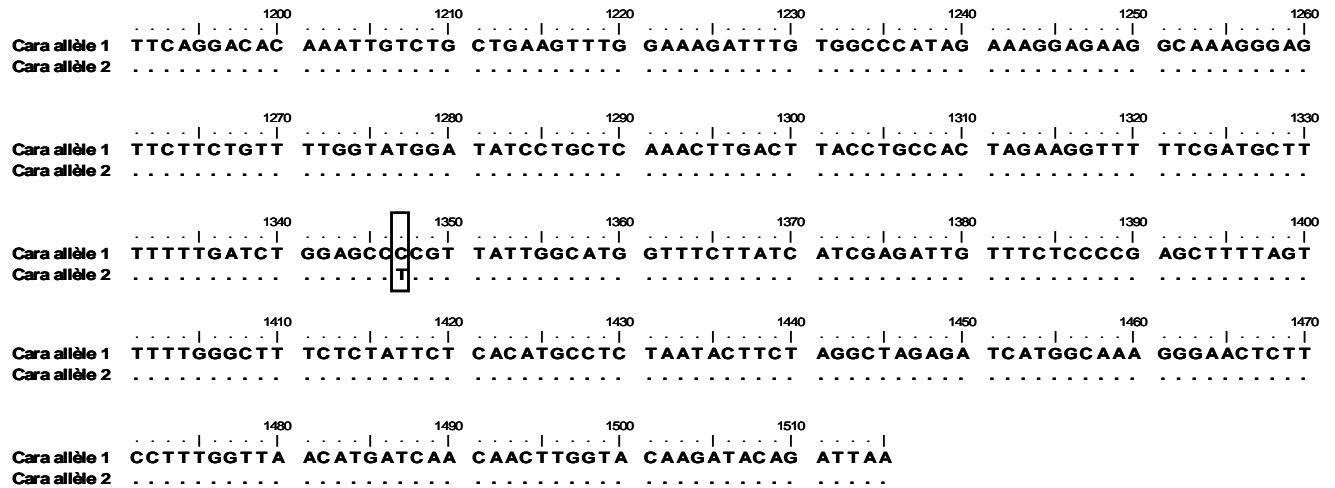
Afin de préciser la diversité allélique du gène *Lcy-b* et d'analyser son éventuelle implication dans l'accumulation différentielle des caroténoïdes dans les sacs à jus de quatre variétés d'oranges, nous avons cloné le gène *Lcy-b* et séquencé tous les allèles chez ces variétés. Nous avons amplifié, pour chaque variété, un fragment de 1515 paires de bases (pb) en utilisant les amorces *Lcy-b\_F* 5'-ATGGATACTGTACTCAAACTCA-3' et *Lcy-b\_R* 5'-TTAATCTGTATCTTGTACCAAGTT-3'. et l'ADN génomique des quatre oranges. Ce couple d'amorces a été défini à partir des séquences du gène *Lcy-b* disponibles dans les bases de données (numéro d'accèsion GenBank : AY094582, AY644699, AF240787, AY679167, AY679168, AY166796, AY217103 et AF152246) et afin d'amplifier la totalité de la séquence codante du gène.

Les fragments obtenus à partir de l'ADN génomique ou de l'ADNc ont la même taille ce qui implique l'absence d'introns pour le gène *Lcy-b*. Nous avons cloné ces fragments de 1515 pb. Afin d'obtenir les deux formes alléliques potentielles pour chaque génotype, nous avons fait le choix de séquencer cinq clones par génotype dans la mesure où nous avons pu montrer que ce gène est présent en une seule copie dans le génome des agrumes. Pour chacune des oranges Shamouti, Sanguinelli et Cara Cara navel, nous avons isolé deux allèles. Les deux allèles de l'orange Cara Cara navel sont aussi ceux de l'orange Sanguinelli. Avec l'orange Shamouti, nous avons obtenu une séquence identique à celle de l'allèle 2 des oranges Cara

Cara et Sanguinelli et une autre séquence comportant deux nucléotides différents toujours par rapport à la séquence de l'allèle 2. Compte tenu des résultats obtenus en DHPLC, qui ne révèlent pas de différence entre Shamouti et Cara Cara/Sanguinelli, et témoignent donc de la présence des 2 allèles, il est probable que tous les clones séquencés pour Shamouti proviennent du même allèle. La séquence avec deux bases de différence par rapport à l'allèle 2 proviendrait donc d'une erreur de séquençage de cet allèle. Les deux allèles séquencés chez les oranges Cara Cara et Sanguinelli présentent des différences au niveau de 14 nucléotides et de 3 acides aminés (Figure 23 et 24). Ces deux allèles codent pour deux protéines de 504 acides aminés. En position 50, la séquence codée par l'allèle 1 présente la méthionine (radical soufré), dans la séquence codée par l'allèle 2, cet acide aminé est remplacé par l'arginine (radical basique). En positions 164 et 332, dans la séquence codée par l'allèle 1, nous trouvons respectivement l'aspartate (radical acide) et l'arginine (radical basique) qui sont remplacés par l'asparagine (radical acide) et la lysine (radical basique) dans la séquence codée par l'allèle 2. Une des deux séquences isolées chez l'orange Shamouti présente des différences par rapport à l'allèle 2 au niveau de deux nucléotides et de deux acides aminés, en position 176, la lysine (radical basique) est remplacée par le glutamate (radical acide) et en position 186 l'asparagine (radical acide) est remplacée par la lysine (radical basique).

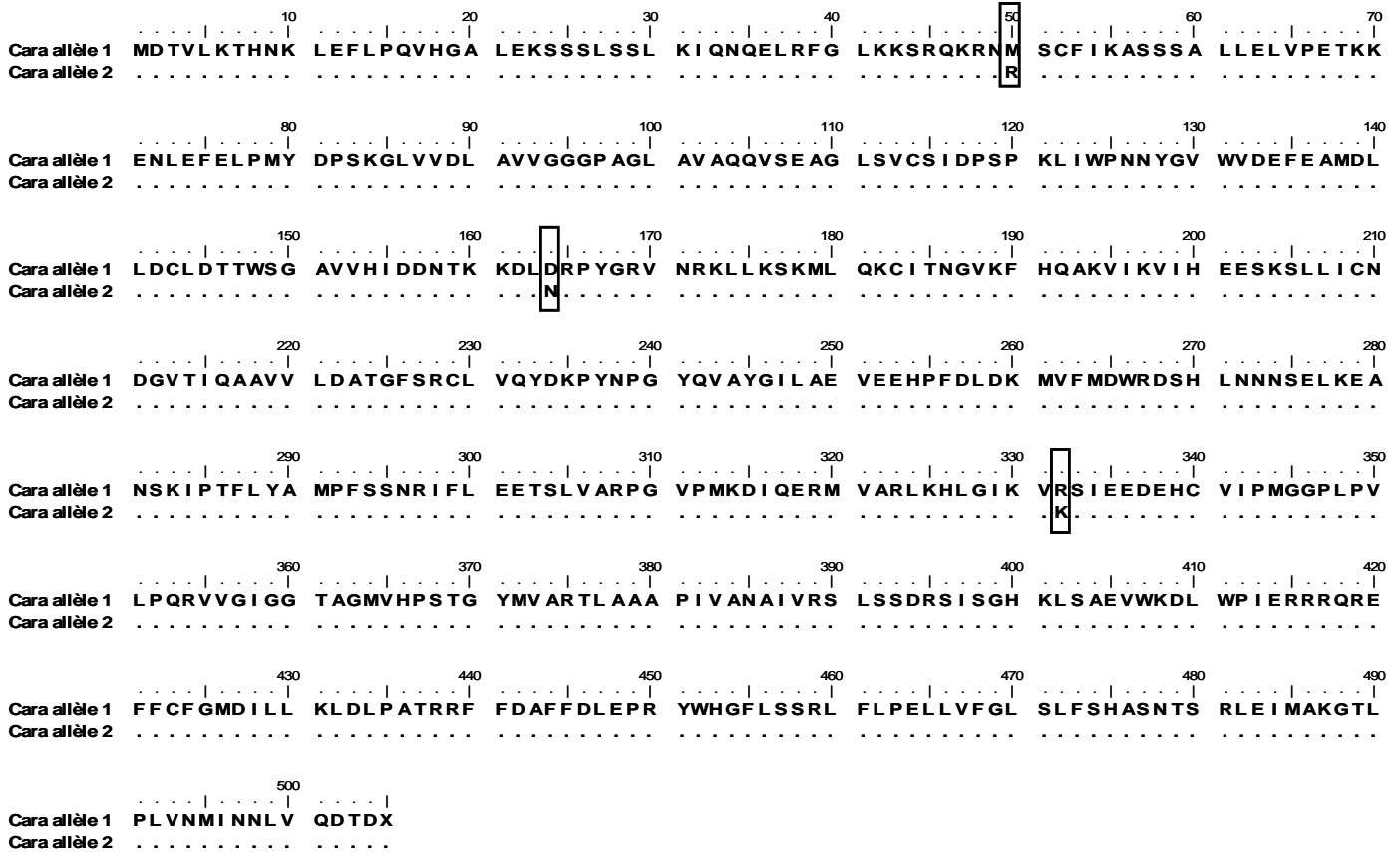


**Figure 23.** Comparaison des séquences des allèles 1 et 2 du gène *Lcy-b* isolés chez l'orange Cara Cara navel/Sanguinelli. La séquence de l'allèle 1 sert de référence. Les portions identiques sont remplacées par des points, seuls les 14 nucléotides différents sont représentés.



**Figure 23.** Comparaison des séquences des allèles 1 et 2 du gène *Lcy-b* isolés chez l'orange Cara Cara navel/Sanguinelli (suite).



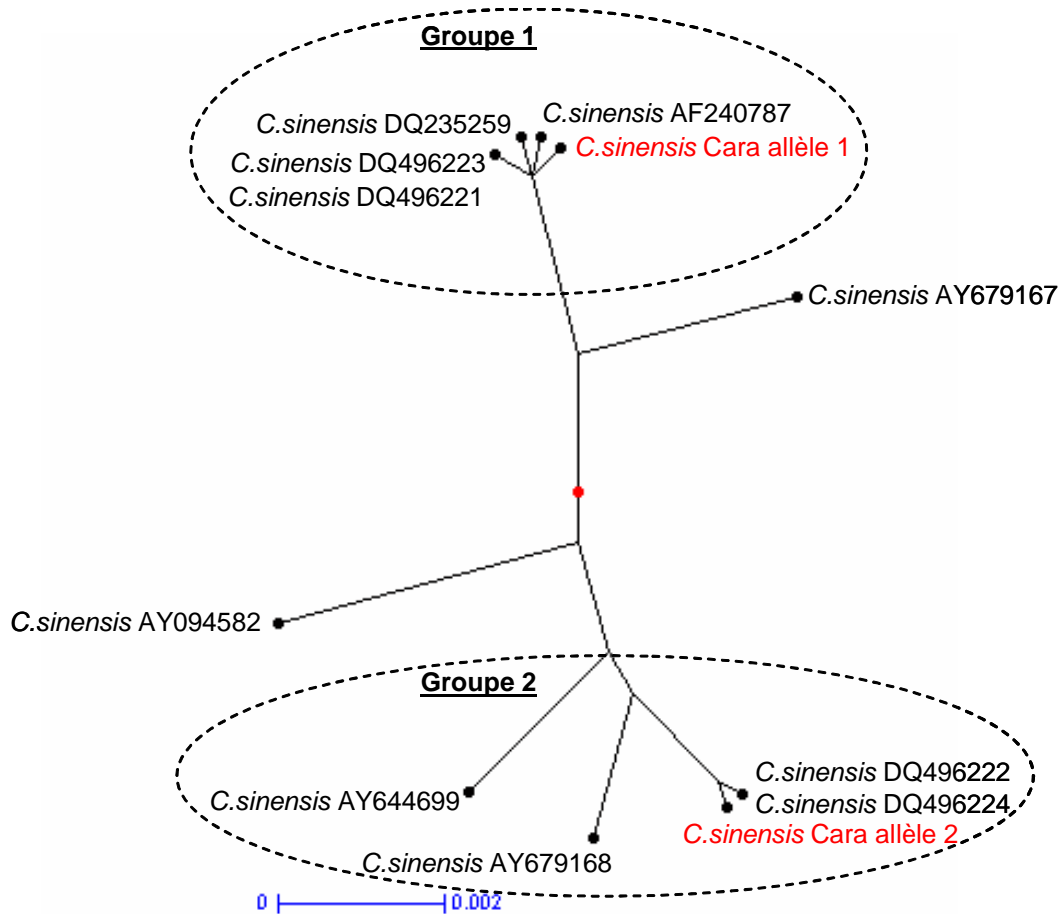


**Figure 24.** Comparaison des séquences d'acides aminés obtenues à partir des allèles 1 et 2 du gène *Lcy-b* isolés chez l'orange Cara Cara/Sanguinelli. La séquence déduite de l'allèle 1 sert de référence, les acides aminés identiques sont représentés par des points tandis que les trois acides aminés différents en position 50, 164 et 332 sont entourés.

Nous avons d'abord comparé les séquences des deux allèles isolés chez l'orange Cara Cara/Sanguinelli aux séquences disponibles dans les bases de données en réalisant un Blastn à partir du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les résultats de cette comparaison sont détaillés dans le Tableau 12 dans lequel nous ne présentons que les séquences les plus proches, isolées chez *C. sinensis*, codant pour une lycopène  $\beta$ -cyclase et comportant une séquence codante complète (1515 pb). Nous avons classé 12 séquences (les deux allèles isolés chez l'orange Cara Cara/Sanguinelli et les 10 séquences présentées dans le Tableau 11) en utilisant une classification hiérarchique ascendante, basée sur le calcul des dissimilarités à partir de l'index de Kimura avec le logiciel @DARwin 5.0 (CIRAD Montpellier, France). Le dendrogramme obtenu est présenté dans la Figure 25.

**Tableau 12.** Caractéristiques des séquences codantes du gène *Lcy-b*, isolées chez *Citrus sinensis* et disponibles dans les bases de données

Source	Séquence	Numéro d'accèsion GenBank	Numéro d'accèsion GenPept
<i>C. sinensis</i> , cv. Cara Cara	Lcy-b, allozyme1, séquence codante complète, isolée à partir ARNm	DQ496223	ABF69943
<i>C. sinensis</i> , cv. Bonanza	Lcy-b, allozyme1, séquence codante complète, isolée à partir ARNm	DQ496221	ABF69941
<i>C. sinensis</i> , cv. Cara Cara	Lcy-b, allozyme2, séquence codante complète, isolée à partir ARNm	DQ496224	ABF69944
<i>C. sinensis</i> , cv. Bonanza	Lcy-b, allozyme2, séquence codante complète, isolée à partir ARNm	DQ496222	ABF69942
<i>C. sinensis</i> , cv. Washington	Lcy-b, séquence codante complète, isolée à partir ADN génomique	AY644699	AAU14144
<i>C. sinensis</i> , cv. Valencia	Lcy-b, séquence codante complète, isolée à partir ADN génomique	AF240787	AAF44700
<i>C. sinensis</i> , cv. Valencia	Lcy-b, séquence codante complète, isolée à partir ARNm	DQ235259	ABB72443
<i>C. sinensis</i> , cv. Cara Cara	Lcy-b, séquence codante complète, isolée à partir ADN génomique	AY094582	AAM21152
<i>C. sinensis</i> , cv. Valencia	Lcy-b, séquence codante complète, isolée à partir ADN génomique	AY679167	AAU05145
<i>C. sinensis</i> , cv. Honganliu	Lcy-b, séquence codante complète, isolée à partir ADN génomique	AY679168	AAU05146


**Figure 25.** Classification des séquences du gène *Lcy-b* isolées chez *Citrus sinensis*.

Nous distinguons deux groupes principaux. L'allèle Cara 1 appartient au premier groupe qui comprend cinq séquences dont celle obtenue à partir de *C. sinensis* cultivar Cara Cara

(numéro d'accèsion GenBank DQ496223, allotype 1), celle obtenue à partir de *C. sinensis* cultivar Bonanza (DQ496221, allotype 1), celle isolée chez *C. sinensis* cultivar Valencia (AF240787) et celle isolée chez *C. sinensis* cultivar Valencia (DQ235259). L'allèle Cara 2 appartient au deuxième groupe qui comprend aussi cinq séquences dont celle obtenue à partir de *C. sinensis* cultivar Cara Cara (numéro d'accèsion GenBank DQ496224, allotype 2), celle obtenue à partir de *C. sinensis* cultivar Bonanza (DQ496222, allotype 2), celle obtenue à partir *C. sinensis* cultivar Honganliu (AY679168) et celle isolée chez *C. sinensis* cultivar Washington (AY644699). Une troisième séquence (AY094582) isolée chez l'orange Cara Cara navel et une autre (AY679167) obtenue à partir de l'orange Valencia ne sont classées dans aucun de ces deux groupes. Étant donné que le gène *Lcy-b* est monolocus dans le génome des agrumes et que nous avons déjà deux séquences différentes pour le gène *Lcy-b* pour ces deux variétés d'orange (une séquence dans chacun des deux groupes distingués), nous faisons l'hypothèse que ces séquences pourraient correspondre à une séquence consensus obtenue après séquençage d'un mélange des deux allèles.

Nous avons ensuite comparé les séquences d'acides aminés obtenues à partir des 12 séquences précédemment décrites. La protéine obtenue à partir de l'allèle 1, isolé chez l'orange Cara Cara/Sanguinelli, est identique à 100% à la lycopène  $\beta$ -cyclase obtenue à partir *C. sinensis* cultivar Cara Cara (DQ496223), et de *C. sinensis* cultivar Bonanza (DQ496221). La protéine obtenue à partir de l'allèle 2, isolé chez l'orange Cara Cara navel/Sanguinelli, est identique à 99% (différence au niveau d'un acide aminé) à la lycopène  $\beta$ -cyclase obtenue à partir de *C. sinensis* cultivar Cara Cara navel (DQ496224) et *C. sinensis* cultivar Bonanza (DQ496222).

#### III.3.2.2.2. Discussion des relations diversité allélique du gène *Lcy-b* chez les oranges et compositions en caroténoïdes

Les deux allèles du gène *Lcy-b* isolés chez l'orange Cara Cara navel sont aussi ceux de l'orange Sanguinelli. L'allèle 1 correspond à une séquence disponible dans les bases de données et qui a été séquencée chez l'orange Cara Cara tandis que l'allèle 2 est aussi très proche de la deuxième séquence isolée chez Cara Cara (différences au niveau de 2 nucléotides). Ces séquences (numéro d'accèsion GenBank DQ496223 et DQ496224) n'étaient pas disponibles lorsque nous avons débuté ce travail. Ces allèles ont aussi été isolés chez d'autres oranges comme l'orange Bonanza. Ainsi, chez les orangers, nous avons montré

la présence de deux allèles du gène *Lcy-b* avec des variations minimales autour de ces deux séquences pouvant être dues à des erreurs de séquençage, à la publication de séquences consensus approximatives ou encore à des mutations ponctuelles. De plus, le phénotype de l'orange Cara Cara navel ne semble pas lié à une diversité dans la séquence codante du gène *Lcy-b*. Des oranges n'accumulant pas de lycopène (cv. Sanguinelli et Bonanza) possèdent ces deux mêmes allèles. De plus, nous avons proposé, à partir de l'analyse du fragment d'ADN porteur du gène *Lcy-b* avec des marqueurs RFLP et SSR, que les pomelos (*C. paradisi*) possédaient deux allèles de pamplemoussier (*C. maxima*) tandis que les orangers étaient hétérozygotes avec un allèle de pamplemoussier et un allèle de mandarinier. Avec le séquençage du gène *Lcy-b* à partir d'un représentant des trois taxons de base et de l'oranger Cara Cara nous avons montré que l'allèle 1 de Cara Cara provient d'un mandarinier et l'allèle 2 d'un pamplemoussier. Ainsi, si l'allèle de pamplemoussier code pour une enzyme peu ou pas fonctionnelle, ce défaut d'activité serait compensé chez l'oranger Cara Cara par l'enzyme codée par l'allèle de mandarinier. Par ailleurs, si jusqu'à présent nous n'avons pas réussi à séquencer ce gène chez l'orange Huang pi Chen, nous pensons que cette orange présente un plus grand polymorphisme dans la séquence du gène *Lcy-b* et que les amorces définies ne permettent pas d'amplifier la séquence de ce gène.

## **IV. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## IV.1. DISCUSSION GENERALE

### **IV.1.1. Structuration de la diversité des compositions en caroténoïdes dans les jus des agrumes cultivés**

Les compositions en caroténoïdes des jus d'agrumes sont complexes. Ces compositions dépendent de plusieurs facteurs : des conditions environnementales, des pratiques culturales, du stade de maturité des fruits et de l'espèce et de la variété. Par ailleurs, l'analyse des teneurs en caroténoïdes des jus d'agrumes est particulièrement intéressante pour la détermination des qualités organoleptiques et nutritionnelles des fruits. En effet, nous rappelons que les caroténoïdes sont des composants majeurs de la qualité des fruits d'agrumes. Ils sont principalement responsables des couleurs jaune, orange et rouge des fruits. Ce sont aussi des micronutriments qui ont plusieurs fonctions biologiques : provitamines A et antioxydants. Ainsi, de nombreux auteurs se sont intéressés aux profils en caroténoïdes des jus d'agrumes. Cependant, ces études concernent principalement les oranges (*C. sinensis*) et analysent souvent une seule variété. De plus, la variété, l'origine géographique et le stade de maturité des fruits ne sont pas toujours précisés. Dans ce contexte, le premier objectif de notre étude était l'analyse de la diversité des compositions en caroténoïdes des fruits du genre *Citrus* en étudiant 25 géotypes représentant les 8 espèces d'agrumes cultivés. Cette analyse, portant sur un nombre élevé d'espèces cultivées sur un même site et soumises aux mêmes pratiques culturales, constitue la première étape pour l'étude de la structuration de la diversité des compositions en caroténoïdes et l'étude des déterminants génétiques de ces compositions. Elle permet aussi de déterminer les variétés les plus intéressantes d'un point de vue organoleptique et nutritionnel.

#### **IV.1.1.1. Rôle du facteur génétique**

Nous avons déterminé les compositions en caroténoïdes des jus de 25 géotypes appartenant au genre *Citrus*. Nous avons récolté les fruits à maturité sur trois arbres (trois clones) en prélevant 15 fruits par arbre soit 45 fruits par géotype. De plus, pour chaque variété, nous avons analysé au moins trois échantillons, ce qui signifie que la séquence extraction/saponification/analyse HPLC a été répétée au moins trois fois. Les données (teneurs en caroténoïdes exprimées en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) ont été analysées par la réalisation d'une ANOVA. Grâce à ces résultats, nous avons montré que le facteur géotype contribue fortement à la variance pour chaque composé. Ainsi, la variabilité génétique est un des facteurs majeurs de la diversité des compositions en caroténoïdes des fruits d'agrumes. Ces

résultats sont en accord avec ceux de KATO *et al.* (2004) qui ont étudié les teneurs en caroténoïdes dans les sacs à jus de trois espèces d'agrumes : *C. unshiu*, *C. sinensis* et *C. limon*. Ces auteurs ont montré que les fruits de ces trois espèces ont des compositions en caroténoïdes très différentes à maturité. La mandarine Satsuma (*C. unshiu*) est caractérisée par des teneurs élevées en  $\beta$ -cryptoxanthine, l'orange valencia (*C. sinensis*) par des teneurs élevées en isomères de violaxanthine et le citron de Lisbonne (*C. limon*) par de très faibles teneurs en caroténoïdes totaux et l'absence de violaxanthine. Ainsi, notre étude généralise ces résultats sur l'importance du facteur génétique.

Nous avons comparé les 25 génotypes sur la base de la présence/absence des caroténoïdes en utilisant la méthode Neighbor Joining et une matrice de dissimilarités de Dice avec le logiciel @DARwin 4.0 pour la construction d'un arbre des distances. Cette analyse nous a permis de distinguer trois groupes. Le premier, que nous appellerons groupe des mandarines (*C. reticulata*) comprend 13 génotypes : 3 mandarines, la clémentine (*C. clementina*), 4 oranges (*C. sinensis*), 3 bigarades (*C. aurantium*), la lime Rangpur (*C. limonia*) et le citron Volkameriana (*C. limonia*). Le deuxième, que nous appellerons groupe des cédrats (*C. medica*), contient 5 génotypes : 2 cédrats, 2 citrons (*C. limon*) et la lime douce de Palestine (*C. limettioides*). Le troisième, que nous appellerons groupe des pamplemousses (*C. maxima*), comprend aussi 5 génotypes : 2 pamplemousses et 3 pomelos (*C. paradisi*). La lime Mexicaine (*C. aurantifolia*) et le pamplemousse Chandler (*C. maxima*) ne sont classés dans aucun des trois groupes. En utilisant la méthode du  $\chi^2$ , nous avons montré que deux caroténoïdes sont à l'origine de cette structuration : la  $\beta$ -cryptoxanthine et la *cis*-violaxanthine. Seuls les génotypes du groupe des mandarines sont capables de synthétiser à la fois ces deux composés. Les génotypes du groupe des cédrats peuvent produire de la  $\beta$ -cryptoxanthine mais sont caractérisés par des très faibles teneurs en caroténoïdes totaux. Les génotypes du groupe des pamplemousses synthétisent du  $\beta$ -carotène mais accumulent surtout du lycopène. Notre étude met ainsi en évidence que les différences interspécifiques sont très marquées.

Nous avons également étudié la structuration de la diversité des compositions en caroténoïdes sur la base des teneurs en composés en utilisant la méthode Neighbor Joining et les distances Euclidiennes avec le logiciel @DARwin 4.0 pour la construction d'un arbre des distances. Les mandarines et la clémentine se distinguent des oranges par des concentrations plus élevées en  $\beta$ -cryptoxanthine et à l'inverse des teneurs plus faibles en *cis*-violaxanthine ce qui confirme les résultats de GOODNER *et al.* (2001). Il est intéressant de noter que les mandarines et la clémentine analysées sont particulièrement riches en  $\beta$ -cryptoxanthine avec

des teneurs variant de  $9,09 \pm 0,55$  à  $17,51 \pm 0,90$  mg.L<sup>-1</sup> selon les cultivars (avec une concentration de  $10,29 \pm 0,70$  pour la mandarine méditerranéenne). KIM *et al.* (2001) ont déterminé des valeurs en  $\beta$ -cryptoxanthine comprises entre 3,2 et 7,8 mg.L<sup>-1</sup> en analysant trois variétés de mandarines à maturité (récoltées en Corée). Seuls KATO *et al.* (2004) ont trouvé des valeurs comparables pour la mandarine Satsuma à maturité (récoltée au mois de janvier au Japon) avec une concentration en  $\beta$ -cryptoxanthine de 15,9 mg.L<sup>-1</sup>. Grâce à ces résultats, nous mettons en évidence que les petits agrumes cultivées en région méditerranéenne sont particulièrement intéressants d'un point de vue organoleptique (couleur naturelle orange vif) et nutritionnel (teneurs élevées en provitamines A et antioxydants). Ceci renforce les résultats de DHUIQUE-MAYER *et al.* (2005) qui ont analysé les compositions en caroténoïdes dans les jus de 8 variétés d'oranges, de la mandarine méditerranéenne et de la clémentine récoltées à San Giuliano et qui ont déterminé des valeurs élevées en  $\beta, \beta$ -xanthophylles pour ces cultivars avec des valeurs comprises entre  $1,35 \pm 0,07$  et  $10,70 \pm 0,45$  mg.L<sup>-1</sup> pour la  $\beta$ -cryptoxanthine ( $10,70 \pm 0,45$  mg.L<sup>-1</sup> pour la mandarine méditerranéenne) et entre  $1,39 \pm 0,07$  et  $6,97 \pm 0,60$  mg.L<sup>-1</sup> pour la *cis*-violaxanthine. Les bigarades, la lime Rangpur et le citron Volkameriana, ayant comme composé majoritaire la  $\beta$ -cryptoxanthine mais des teneurs moyennes en caroténoïdes totaux (valeurs comprises entre  $2,26 \pm 0,21$  et  $8,40 \pm 0,16$  mg.L<sup>-1</sup>), sont plus proches du groupe des cédrats dont les génotypes présentent tous des faibles teneurs en caroténoïdes totaux (valeurs comprises entre  $0,18 \pm 0,03$  et  $1,26 \pm 0,07$  mg.L<sup>-1</sup>). L'orange Huang pi Chen qui présente aussi de faibles teneurs en caroténoïdes totaux ( $1,74 \pm 0,09$  mg.L<sup>-1</sup>) est éloignée des autres oranges. Le groupe des pamplemousses apparaît plus dispersé avec de fortes variations des concentrations en lycopène pour les différents génotypes (valeurs comprises entre  $0,30 \pm 0,10$  et  $10,07 \pm 0,65$  mg.L<sup>-1</sup>). Nous montrons ainsi que la variabilité intraspécifique dépend surtout des variations quantitatives en caroténoïdes.

#### **IV.1.1.2. Relation entre diversité des profils en caroténoïdes et diversité génétique des agrumes cultivés, hypothèse sur les liens entre le processus de diversification phénotypique et l'évolution des agrumes cultivés**

L'analyse de la diversité des compositions en caroténoïdes des jus des 25 génotypes appartenant au genre *Citrus* a permis de mettre en évidence le rôle important du facteur génétique, les autres facteurs de variations étant minimisés par ailleurs. Ceci nous conduit à une analyse plus fine des liens entre diversité phénotypique et diversité génétique.

A partir de la présence/absence des composés, nous avons classé les génotypes en trois groupes : le groupe des mandarines (*C. reticulata*), le groupe des cédrats (*C. medica*) et le groupe des pamplemousses (*C. maxima*). Ces trois espèces sont considérées comme étant les



trois espèces de base à partir desquelles dériveraient les espèces secondaires. La différenciation de ces trois taxons de base serait due à un processus de fondation dans trois zones géographiques et à une évolution allopatrique. Les autres espèces auraient été formées par des événements de recombinaisons sexuelles intervenus plus tard entre les espèces de base mises en contact grâce aux échanges commerciaux et aux migrations humaines (BARRET et RHODES, 1976 ; OLLITRAULT *et al.*, 1992c ; HERRERO *et al.*, 1996 ; HERRERO *et al.*, 1997 ; FEDERICI *et al.*, 1998 ; NICOLOSI *et al.*, 2000 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000 ). Nos résultats suggèrent que l'évolution des agrumes cultivés est le principal facteur d'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes. Ainsi, l'organisation des agrumes révélée par la composition en caroténoïdes est en accord avec les organisations établies précédemment par l'utilisation de marqueurs moléculaires neutres (HERRERO *et al.*, 1996 ; HERRERO *et al.*, 1997 ; FEDERICI *et al.*, 1998 ; NICOLOSI *et al.*, 2000 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000 ). D'après nos résultats, les oranges (*C. sinensis*) et les bigarades (*C. aurantium*) sont dans le groupe des mandarines (*C. reticulata*). D'après plusieurs auteurs, les orangers et les bigaradiers sont proches des mandariniers mais ont introgressé des fragments du génome nucléaire des pamplemoussiers (HERRERO *et al.*, 1996 ; FEDERICI, *et al.*, 1998 ; OLLITRAULT *et al.*, 1999 ; NICOLOSI *et al.*, 2000 ; LURO *et al.*, 2001 ; BARKLEY *et al.*, 2006). Nous avons montré que la clémentine (*C. clementina*) est dans le groupe des mandarines. Les études précédentes s'accordent sur le fait que la clémentine est un hybride entre une mandarine et une orange (NICOLOSI *et al.*, 2000 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000). La lime Rangpur et le citron Volkameriana appartiennent aussi au groupe des mandarines. La lime Rangpur et le citron Volkameriana seraient des hybrides respectivement entre un cédrat et une mandarine et entre un citron et une bigarade recroisés avec une mandarine (NICOLOSI *et al.* 2000). Le citron Eureka, le citron Meyer (*C. limon*) et la lime douce de Palestine (*C. limettioides*) appartiennent au groupe des cédrats. NICOLOSI *et al.* 2000 suggèrent que les citrons sont des hybrides entre cédrats et bigarades tandis que la lime douce de Palestine un hybride entre un cédrat et une orange. D'après nos résultats, les pomelos (*C. paradisi*) appartiennent au groupe des pamplemousses. Les études moléculaires suggèrent que ce sont des hybrides entre des pamplemousses et des oranges. Enfin, la lime Mexicaine (*C. aurantifolia*), qui apparaît isolée dans notre étude, serait un hybride entre un cédrat et *C. micrantha* espèce qui ne fait pas partie de notre analyse (NICOLOSI *et al.* 2000). Les liens observés entre la composition en caroténoïdes et la diversité génétique des agrumes nous a conduit à formuler l'hypothèse que l'évolution des agrumes cultivés est le principal facteur d'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes.

#### **IV.1.1.3. Relations entre les profils en caroténoïdes et les étapes de la voie de biosynthèse, hypothèse sur les étapes clés et leurs régulations**

Notre premier objectif était d'analyser la structuration de la diversité des compositions en caroténoïdes des jus des agrumes et d'étudier l'importance du facteur génétique et ainsi les liens entre diversité des compositions en caroténoïdes et diversité génétique des agrumes. L'analyse d'un grand nombre d'espèces représentant l'ensemble des agrumes cultivés permet aussi de proposer quelles étapes de la chaîne de biosynthèse semblent constituer des étapes clés dans la structuration de la diversité phénotypique interspécifique et intraspécifique.

Les génotypes du groupe des mandarines accumulent de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la *cis*-violaxanthine, deux  $\beta,\beta$ -xanthophylles de fin de la chaîne de biosynthèse. Certains génotypes de ce groupe, les trois mandarines, la clémentine et les quatre oranges, produisent aussi de l' $\alpha$ -carotène, de la zeinoxanthine et de la lutéine qui sont des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles. Ces derniers génotypes explorent les deux branches de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Dans ce groupe, les mandarines et la clémentine se distinguent des oranges par un rapport  $\beta$ -cryptoxanthine / *cis*-violaxanthine supérieur ou égal à 1,5 tandis que ce rapport est inférieur ou égal à 0,3 chez les oranges. Les génotypes du groupe des cédrats synthétisent de la  $\beta$ -cryptoxanthine. Les produits situés en aval dans cette branche de la chaîne de biosynthèse ne sont pas présents et les génotypes du groupe des cédrats sont caractérisés par des très faibles concentrations en caroténoïdes totaux. Les génotypes du groupe des pamplemousses ne synthétisent que des carotènes : phytoène, phytofluène, lycopène et  $\beta$ -carotène. Ils n'accumulent pas les produits situés en aval dans cette branche de la chaîne de biosynthèse. Ces résultats suggèrent que les étapes catalysées par la  $\beta$ -carotène hydroxylase (HY-b) et la zéaxanthine époxydase (ZEP), impliquées dans la formation de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la *cis*-violaxanthine à partir du  $\beta$ -carotène, jouent un rôle important dans la différenciation des génotypes du groupe des mandarines par rapport aux génotypes des deux autres groupes et aussi dans les variations relevées entre les génotypes du groupe des mandarines comme entre les mandarines et les oranges. KATO *et al.* (2004) suggèrent également que la diversité des compositions en  $\beta,\beta$ -xanthophylles entre la mandarine Satsuma et l'orange Valencia est liée à la  $\beta$ -carotène hydroxylase (HY-b), à sa spécificité de substrat et l'équilibre entre le niveau d'expression des gènes situés en amont et des gènes situés en aval des étapes catalysées par HY-b. En effet, HY-b transformerait plus efficacement le  $\beta$ -carotène en  $\beta$ -cryptoxanthine que la  $\beta$ -cryptoxanthine en zéaxanthine. De plus, les gènes codant pour des enzymes situées en amont sont plus exprimés dans les sacs à jus de la mandarine tandis que ceux situés en aval sont moins exprimés ce qui accroît les quantités du substrat  $\beta$ -carotène (KATO *et al.*, 2004).

La Lycopène  $\epsilon$ -cyclase (LCY-e) qui transforme le lycopène en  $\alpha$ -carotène paraît jouer un rôle important dans les différences phénotypiques relevées entre les mandarines, la clémentine et les oranges d'une part et les bigarades, la lime Rangpur et le citron Volkameriana d'autre part. Chez la tomate, le phénotype du mutant *Delta*, qui accumule du  $\delta$ -carotène à la place du lycopène, est lié à la présence d'un allèle spécifique du gène *Lcy-e*. Cet allèle diffère de celui du type commun au niveau de la séquence promotrice ce qui entraîne la surexpression du gène *Lcy-e* dans les fruits du mutant *Delta* (RONEN *et al.*, 1999). Un tel mécanisme peut être à l'origine des différences en ce qui concerne l'accumulation de l' $\alpha$ -carotène et des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles dans les fruits des génotypes du groupe des mandarines. En ce qui concerne les génotypes du groupe des cédrats, la phytoène synthétase (PSY), catalysant la première étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, semble jouer un rôle important dans la faible accumulation des caroténoïdes dans les jus de ces génotypes. Les analyses chez la tomate ont montré que l'étape catalysée par PSY constitue une étape clé dans la synthèse des caroténoïdes des fruits et que le gène codant pour cette enzyme est surexprimé au cours de la maturation des fruits ce qui est lié à une accumulation massive de caroténoïdes (BRAMLEY *et al.*, 2002 ; FRASER *et al.*, 2002). D'après KATO *et al.* (2004), le niveau d'expression de l'ensemble des gènes conduisant aux  $\beta,\beta$ -xanthophylles est plus faible dans les sacs à jus du citron de Lisbonne par rapport au niveau relevé dans les fruits de la mandarine Satsuma mais comparable à celui relevé dans les sacs à jus de l'orange Valencia. De plus, les quantités d'ARNm du gène *CitNced2*, codant pour une enzyme catalysant la transformation de la *cis*-violaxanthine en xanthoxine, sont plus élevées dans les sacs à jus du citron de Lisbonne que dans les sacs à jus de l'orange Valencia (KATO *et al.*, 2006). Ces mécanismes semblent impliqués dans la faible accumulation des caroténoïdes dans les sacs à jus du citron de Lisbonne. Ceci souligne l'importance des étapes catalysées par PSY et NCED pour les compositions en caroténoïdes des jus des agrumes acides. La transformation du lycopène en  $\beta$ -carotène catalysée par la lycopène  $\beta$ -cyclase (LCY-b) semble être une étape clé pour les génotypes du groupe des pamplemousses. Les fruits de la tomate sont caractérisés à maturité par de fortes concentrations en lycopène et des teneurs plus faibles en  $\beta$ -carotène et autres carotènes. L'accumulation du lycopène semble être liée à l'augmentation de l'expression des gènes *Psy* et *Pds* et à la diminution de l'expression des gènes *Lcy-b* et *Lcy-e* au cours de la maturation des fruits de la tomate (FRASER *et al.*, 1994 ; BRAMLEY *et al.*, 2002). Chez la tomate, le phénotype du mutant *Beta*, qui accumule du  $\beta$ -carotène à la place du lycopène dans les fruits, est lié au gène *B* codant pour une lycopène  $\beta$ -cyclase et surexprimé dans les fruits du mutant (RONEN *et al.*, 2000). Ces mécanismes intervenant au niveau du gène codant pour LCY-b chez la tomate (niveau d'expression du gène ou présence d'un gène spécifique) peuvent être également à l'origine du phénotype des variétés du groupe des pamplemousses.

Nous pouvons formuler trois hypothèses concernant les mécanismes de régulations des étapes clés : (1) il existe une diversité des allèles des gènes codant pour ces étapes ce qui a pour conséquence soit une modification de l'activité spécifique des enzymes correspondantes soit une variation de l'expression des gènes codant pour ces étapes ; (2) des variations au niveau des séquences régulatrices externes aux gènes (promoteurs, facteurs de transcription, régulations épigénétiques) entraînent une expression différentielle des gènes codant pour les étapes clés de la biosynthèse des caroténoïdes chez les agrumes ; (3) la variabilité des étapes clés dans la structuration de la diversité phénotypique n'est pas liée à une variation qualitative (allèles) ou quantitative (expression) des gènes codants pour les enzymes des différentes étapes de la chaîne de biosynthèse mais à celle d'autres éléments (cofacteurs, modifications post-transcriptionnelles). Dans la suite de notre travail, nous nous sommes appliqués à tester les deux premières hypothèses. La différenciation interspécifique est de nature qualitative tandis que le polymorphisme intraspécifique est principalement quantitatif. On peut penser que la régulation au niveau transcriptionnel est un élément majeur des variations des compositions intraspécifiques.

#### **IV.1.2. Diversité phylogénétique des principaux gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes**

Le deuxième objectif de cette étude était l'analyse des liens entre la diversité phylogénétique des principaux gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et la diversité des compositions en caroténoïdes des jus d'agrumes. Ces analyses ont été réalisées sur 25 génotypes, précédemment caractérisés en ce qui concerne leur composition en caroténoïdes, avec l'utilisation de marqueurs RFLP et SSR. Pour les analyses RFLP, trois enzymes de restriction *EcoRV*, *BamHI* et *HindIII* ont été utilisées pour la digestion de l'ADN génomique des 25 génotypes. Sept sondes correspondant à une portion des séquences codantes des sept gènes : *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* ont été marquées avec [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ce qui a permis de révéler le polymorphisme à l'intérieur des séquences de ces gènes (site de restriction dans la séquence de ces gènes) ou aux alentours de ces gènes (sites de restriction à l'extérieur de la séquence de ces gènes). En ce qui concerne les analyses SSR, le motif microsatellite amplifié se trouve à l'intérieur de la séquence codante du gène *Hy-b* et à l'extérieur de la séquence codante du gène *Lcy-b*.

##### **IV.1.2.1. Nombre de copies de sept gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes**

Le nombre de copies, pour les sept gènes analysés, varie de une pour le gène *Lcy-b* à au moins trois pour le gène *Zds*.

## Gène codant pour la phytoène synthétase (PSY)

Les profils RFLP obtenus avec *EcoRV* et *BamHI* comportent deux à trois bandes par géotypes. De plus, il n'y a pas de site de restriction de ces deux enzymes dans la séquence de la sonde qui correspond à une portion de la séquence codante du gène *Psy*. D'après ces résultats, nous suggérons que deux copies du gène *Psy* sont présentes dans le génome des *Citrus*. Ces résultats sont en accord avec ceux d'IKOMA *et al.* (2001) qui ont obtenus des profils RFLP avec deux ou trois bandes en utilisant les enzymes de restriction *DraI*, *EcoRI* et *HindIII* et l'ADN génomique de la mandarine Satsuma (*C. unshiu*). Deux copies du gène *Psy* ont été trouvées dans le génome de la tomate (*Lycopersicon esculentum*), du tabac (*Nicotiana tabacum*), du maïs (*Zea mays*) et du riz (*Oryza sativa*) (BARTLEY ET SCOLNIK, 1993 ; BUSCH *et al.*, 2002 ; GALLAGHER *et al.*, 2004) et une seule copie dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* et du poivron (*Capsicum annuum*) (ROMER *et al.*, 1993 ; LANGE ET GHASSEMIAN, 2003). De plus, les études chez la tomate ont montré que *Psy1* est transcrit dans les chromoplastes des fruits tandis que *Psy2* est spécifique des feuilles (BARTLEY et SCOLNIK, 1993). De même, d'après GALLAGHER *et al.* (2004), un seul des deux gènes *Psy*, *Psy1* et non *Psy2* est transcrit dans les tissus de l'endosperme du riz et du maïs. Nous n'avons pas de résultat similaire chez les agrumes.

## Gène codant pour la phytoène désaturase (PDS)

Avec la sonde *Pds* et l'enzyme de restriction *EcoRV*, les profils révélés présentent deux ou trois fragments par géotype. De plus, *EcoRV* ne coupe pas la séquence de la sonde. Ces résultats mettent en évidence que deux copies du gène *Pds* seraient présentes dans le génome des *Citrus*. KITA *et al.* (2001), suggèrent que *Pds* est présent en un faible nombre de copies chez les *Citrus*. En revanche, les études sur *Arabidopsis thaliana*, la tomate, le maïs et le riz n'ont mis en évidence qu'un seul locus pour le gène *Pds* (CORONA *et al.*, 1996 ; LANGE et GHASSEMIAN, 2003 ; MATTHEWS *et al.*, 2003).

## Gène codant pour la ζ-carotène désaturase (ZDS)

Les profils RFLP obtenus avec la sonde *Zds* présentent deux à six fragments par géotype avec *EcoRV* et trois à cinq fragments avec *BamHI*. Il n'y a pas de site de restriction pour les enzymes *EcoRV* et *BamHI* dans la séquence de la sonde. Ainsi, il y aurait au moins trois loci pour le gène *Zds* chez les *Citrus*. Comme pour *Pds*, une seule copie du gène *Zds* serait présente dans les génomes d'*Arabidopsis thaliana*, du maïs et du riz (LANGE et GHASSEMIAN, 2003 ; MATTHEWS *et al.*, 2003). Nous n'avons pas trouvé d'autre étude analysant le nombre de copies de *Zds* dans le génome des agrumes.

Gène codant pour la lycopène  $\beta$ -cyclase (LCY-b)

Avec la sonde *Lcy-b* et l'enzyme *EcoRV*, nous avons obtenu une à deux bandes par génotype. De même, avec les analyses SSR, les profils présentent un à deux fragments par génotype. Nous suggérons ainsi la présence d'une seule copie pour le gène *Lcy-b* chez les *Citrus*. Les analyses chez la tomate montrent la présence de deux copies du gène *Lcy-b*. Un gène code pour une enzyme spécifique des chromoplastes des fruits tandis que l'autre code pour une enzyme spécifique des chloroplastes des feuilles (RONEN *et al.*, 2000). Il n'y a pas, à notre connaissance, d'étude similaire chez les agrumes.

Gène codant pour la lycopène  $\epsilon$ -cyclase (LCY-e)

Les profils obtenus avec la sonde *Lcy-e* comportent un à trois fragments par génotype avec *EcoRV* et un à cinq avec *HindIII*. Les variétés de *C. medica* et de *C. maxima* ne présentent qu'une seule bande que ce soit avec *EcoRV* ou *HindIII*. De plus, il n'y a pas de site de restriction pour *EcoRV* dans la séquence de la sonde tandis que l'enzyme *HindIII* coupe une fois la séquence de la sonde. Nous proposons ainsi que le gène *Lcy-e* est présent en une seule copie dans le génome de *C. medica* et *C. maxima* et présent en deux copies dans le génome de *C. reticulata* et des autres espèces. RONEN *et al.* (1999) suggèrent qu'il n'y a qu'une copie du gène *Lcy-e* chez la tomate. A notre connaissance, il n'y a pas d'autre étude sur le nombre de copies de ce gène chez les agrumes.

Gène codant pour la  $\beta$ -carotène hydroxylase (HY-b)

Avec la sonde *Hy-b* et les enzymes de restriction *EcoRV* et *BamHI*, nous avons obtenu un à deux fragments par génotype. De même, avec les analyses SSR, les profils présentent un à deux fragments par variété. Ces deux enzymes ne coupent pas la séquence de la sonde. Ainsi, il y aurait un seul locus pour ce gène dans le génome des *Citrus*. Cependant, avec cette hypothèse, les trois variétés de pamplemousse sont hétérozygotes avec le même profil pour les deux enzymes ce qui est peu probable. KIM *et al.* (2001) ont isolé deux clones codant pour HY-b à partir du flavédo et des sacs à jus de la mandarine Satsuma. Les séquences de ces deux clones sont très proches (différences au niveau de six nucléotides) et les auteurs de cette étude suggèrent que ce sont deux allèles d'un même gène. Deux copies du gène *Hy-b* ont été mises en évidence chez *Arabidopsis thaliana* et chez la tomate (HIRSCHBERG, 2001 ; Lange et GHASSEMIAN, 2003). Chez la tomate, comme pour *Psy* et *Lcy-b*, un gène est exprimé dans les tissus des fruits et l'autre dans les tissus chlorophylliens (HIRSCHBERG, 2001). D'autres analyses, avec de nouvelles enzymes de restriction et l'utilisation de génotypes haploïdes sont nécessaires pour pouvoir conclure sur le nombre de copies du gène *Hy-b* dans le génome des *Citrus*.

Gène codant pour la zéaxanthine époxidase (ZEP)

Avec la sonde *Zep* et l'enzyme de restriction *EcoRV*, nous avons obtenu deux à quatre fragments par génotype. De plus il n'y a pas de site de restriction d'*EcoRV* dans la séquence de la sonde *Zep*. Ainsi, nous proposons que *Zep* est présent en deux copies dans le génome des *Citrus*. Les études sur *Arabidopsis thaliana* montrent la présence d'une seule copie du gène *Zep* (XIONG *et al.*, 2002 ; LANGE et GHASSEMIAN, 2003). Il n'y a pas d'étude similaire chez les agrumes.

#### **IV.1.2.2. Cohérence entre les relations phylogénétiques inférées pour ces sept gènes et les hypothèses sur l'origine des espèces d'agrumes cultivées,**

L'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes dans les fruits d'agrumes coïncide avec l'organisation de la diversité génétique précédemment mise en évidence avec l'existence de trois taxons de base à partir desquels dériveraient les autres espèces de *Citrus*. Nous avons formulé l'hypothèse que le processus d'évolution des agrumes est le principal facteur d'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes des jus d'agrumes. De même, l'organisation globale de la diversité génétique, dans ou autour des gènes de biosynthèse des caroténoïdes, basée sur les profils RFLP est en accord avec les structurations obtenues avec des marqueurs moléculaires neutres (HERRERO *et al.*, 1996 ; HERRERO *et al.*, 1997 ; FEDERICI *et al.*, 1998 ; NICOLOSI *et al.*, 2000 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000 ; LURO *et al.*, 2001). Avec ces marqueurs RFLP, nous avons obtenu une forte différenciation entre les trois espèces de base avec de nombreux fragments spécifiques d'une de ces espèces. De plus, les espèces de base présentent des profils RFLP avec un nombre moyen de bandes plus faible que celui obtenu pour les espèces secondaires, ce qui indique que ces dernières sont plus hétérozygotes. Nous avons également reconstitué des profils pour les espèces secondaires à partir des allèles définis pour les espèces de base pour les gènes *Psy*, *Pds*, *Lcy-b* et *Lcy-e*. Ces profils sont en accord avec la structuration de la diversité génétique des agrumes.

Les orangers (*C. sinensis*) et les bigaradiers (*C. aurantium*) seraient proches des mandariniers mais auraient introgressé des fragments du génome nucléaire des pamplemoussiers (*C. maxima*) (HERRERO *et al.*, 1996 ; FEDERICI, *et al.*, 1998 ; OLLITRAULT *et al.*, 1999 ; NICOLOSI *et al.*, 2000 ; LURO *et al.*, 2001 ; BARKLEY *et al.*, 2006). Pour les gènes *Psy* et *Lcy-b*, ces deux espèces sont hétérozygotes et présentent le même allèle de mandarine et deux allèles différents de pamplemousse. Dans le cas du gène *Pds*, les profils sont identiques pour ces deux espèces qui possèdent un allèle de mandarine et

un allèle de pamplemousse. Pour le gène *Lcy-e*, les oranges présentent deux allèles de mandarine tandis que les bigarades ont un allèle de mandarine et un allèle de pamplemousse. Les oranges sont globalement plus proches des mandarines que les bigarades. La clémentine serait un hybride entre la mandarine méditerranéenne et une orange (NICOLASI *et al.*, 2000). La clémentine (*C. clementina*) est hétérozygote pour le gène *Psy* avec deux allèles de mandarine dont l'un est présent dans les oranges et l'autre est spécifique de la mandarine méditerranéenne. Les résultats obtenus avec les gènes *Pds* et *Lcy-b* montrent que la clémentine est hétérozygote avec un allèle de mandarine et un allèle de pamplemousse (présent également dans les oranges). Le profil obtenu pour le gène *Lcy-e* est identique à celui des oranges avec deux allèles de mandarine. Les pomelos seraient des hybrides entre pamplemousses et oranges (NICOLASI *et al.*, 2000 ; OLLITRAULT *et al.*, 2000). Les profils obtenus pour le gène *Psy* sont identiques à ceux des oranges avec un allèle de pamplemousse et un allèle de mandarine. Avec les gènes *Pds* et *Lcy-b*, les pomelos ne présentent que des allèles de pamplemousse qui sont aussi présents chez les oranges. Les pomelos sont hétérozygotes pour le gène *Lcy-e* avec un allèle de mandarine et un allèle pamplemousse. Les citrons (*C. limon*) seraient des hybrides entre cédrats et bigarades (NICOLASI *et al.*, 2000). Le citron Eureka est hétérozygote pour le gène *Psy* avec un allèle de cédrat et un allèle de pamplemousse qui est également présent chez les bigarades. Pour les gènes *Pds*, *Lcy-b* et *Lcy-e*, le citron Eureka est aussi hétérozygote avec un allèle de cédrat et un allèle de mandarine qui est présent chez les bigarades. La lime Mexicaine (*C. aurantifolia*) semble être un hybride entre un cédrat et *C. micrantha* (NICOLASI *et al.*, 2000). Dans les profils obtenus pour les gènes de biosynthèse un allèle de cédrat est toujours présent. De plus, nous avons trouvé trois bandes spécifiques à la lime Mexicaine et non observées chez les trois taxons de base avec les marqueurs RFLP et une bande avec les marqueurs SSR. Ces allèles proviendraient de *C. micrantha*.

Ces résultats sur la diversité phylogénétique des gènes de biosynthèse des caroténoïdes sont en accord avec le processus d'évolution des agrumes selon lequel les espèces secondaires seraient issues des espèces de base par des phénomènes d'hybridation.

#### **IV.1.2.3. Relations entre la diversité phylogénétique pour ces sept gènes et la diversité phénotypique au niveau interspécifique**

Nous avons proposé que les étapes catalysées par les enzymes PSY, LCY-b, LCY-e, HY-b et ZEP constituent des étapes clés impliquées dans la diversité des compositions en caroténoïdes au sein du genre *Citrus*. Les enzymes LCY-e, HY-b et ZEP semblent jouer un



rôle important pour les génotypes du groupe des mandarines, PSY paraît contrôler une étape clé pour les génotypes du groupe des cédrats et LCY-b pour les génotypes du groupe des pamplemousses. Les deux principales hypothèses concernant les mécanismes de régulation à ces étapes sont (1) une variation dans la séquence du gène ; (2) une variation de l'expression du gène. Une modification de la séquence du gène peut entraîner une modification de l'activité de l'enzyme ou une variation de l'expression du gène. Les résultats concernant la diversité phylogénétique des gènes de biosynthèse des caroténoïdes apportent des éléments de réponse concernant la première hypothèse.

L'étape catalysée par la phytoène synthétase codée par le gène *Psy* semble impliquée dans la différenciation des cédrats, des citrons Meyer et Eureka et de la lime douce de Palestine des autres génotypes ; ces premières variétés étant caractérisées par des concentrations très faibles en caroténoïdes totaux. Les cédrats, les citrons, la lime douce de Palestine mais aussi la lime Rangpur et le citron Volkameriana présentent des profils homozygotes avec deux allèles de cédrat pour le locus du gène *Psy* pour lequel du polymorphisme a été mis en évidence. La lime Rangpur et le citron Volkameriana présentent des teneurs en caroténoïdes totaux intermédiaires entre celles des cédrats/citrons et celles des mandarines/oranges. Ainsi, la diversité phénotypique ne semble pas liée à la diversité mise en évidence autour du gène *Psy*. Nous suggérons que le phénotype des cédrats/citrons dépend du niveau de transcription des gènes impliqués dans les premières étapes de la synthèse du phytoène (*Dxs* et *Psy*) et des gènes responsables de la dégradation de la violaxanthine (*Nced*). En effet, des études chez la tomate (LOIS *et al.*, 2000 ; BRAMLEY, 2002 ; BOTELLA-PAVIA et RODRIGUEZ-CONCEPTION, 2006 ; SANDMANN *et al.*, 2006) ont montré l'importance de la régulation des gènes *Dxs* et *Psy* au niveau transcriptionnel pour l'accumulation des caroténoïdes tandis que KATO *et al.* (2006) soulignent les liens entre absence de violaxanthine chez le citron et surexpression du gène *CitNced2*.

L'étape catalysée par LCY-b semble limitante et impliquée dans l'accumulation du lycopène pour les génotypes du groupe des pamplemoussiers/pomelos. Les analyses RFLP montrent que ce gène est présent en une seule copie chez les *Citrus* et que seuls les pomelos possèdent deux allèles de pamplemoussiers alors que les autres espèces secondaires sont hétérozygotes avec un allèle de pamplemoussier ou de cédratier et systématiquement un allèle de mandarinier. La limitation de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes à cette étape, chez les pamplemoussiers et pomelos, pourrait donc être liée à une variabilité allélique du gène. De plus, les analyses par DHPLC de la diversité de la séquence codante du gène *Lcy-b* au sein de notre collection de référence confirment la structuration mise en évidence avec les marqueurs RFLP et SSR : (1) les trois taxons de base apparaissent fortement différenciés ; (2) la diversité

intraspécifique est faible (3) l'oranger est hétérozygote avec un allèle de pamplemoussier et un allèle de mandarinier. La séquence du gène *Lcy-b* isolée chez le pamplemousse sans pépin diffère de celle isolée chez la mandarine méditerranéenne au niveau de 14 bases. Cette variabilité dans la séquence codante du gène *Lcy-b* pourrait être responsable d'une modification de l'activité de l'enzyme LCY-b chez les pamplemoussiers et pomelos.

Nous avons vu que seules les mandarines, clémentines et oranges accumulent de l' $\alpha$ -carotène, de la zeinoxanthine et de la lutéine. Cette différenciation est associée à l'étape de la chaîne de biosynthèse catalysée par l'enzyme LCY-e. Nous avons proposé, à partir des profils RFLP que le gène *Lcy-e* est présent en une seule copie chez *C. medica* et *C. maxima* et en deux copies chez *C. reticulata* et les espèces secondaires. De plus, avec cette hypothèse, seules les mandarines, clémentines et oranges sont homozygotes avec un allèle de mandarine pour le locus commun. Ainsi, les variations interspécifiques dans l'accumulation des  $\beta$ , $\epsilon$ -xanthophylles pourraient être liées à la diversité allélique pour le gène *Lcy-e*.

Deux enzymes sont impliquées dans la synthèse de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la violaxanthine : HY-b et ZEP. Seuls les génotypes du groupe des mandarines produisent à la fois ces deux composés. Les analyses RFLP et SSR pour ces gènes suggèrent que la différenciation des génotypes du groupe des mandarines par rapport aux autres *Citrus* n'est pas liée à la diversité allélique pour ces deux gènes. En effet, les pomelos qui ne produisent pas de  $\beta$ -cryptoxanthine mais du  $\beta$ -carotène et surtout du lycopène ont des profils identiques ou proches de ceux des mandarines et des oranges.

#### **IV.1.3. Diversité d'expression des gènes de la voie du MEP et de la voie de biosynthèse des caroténoïdes**

Le troisième objectif de notre travail a consisté en l'analyse de l'expression de sept gènes (*Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep*) dans les sacs à jus de quatre oranges, d'un citron et d'un pamplemousse. Le gène *Dxs*, codant pour une enzyme catalysant la première étape de la voie du méthylérythritol phosphate, a été ajouté à cette étude car les travaux chez la tomate soulignent l'importance de la régulation de l'expression de ce gène dans la synthèse des caroténoïdes (LOIS *et al.*, 2000 ; RODRIGUEZ-CONCEPTION *et al.*, 2003 ; BOTELLA-PAVIA *et al.*, 2004). Nous n'avons pas pu étudier l'expression du gène *Lcy-e* dans les sacs à jus des oranges, du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red, les quantités de transcrits étant trop faibles et les analyses étant ainsi peu répétables. Les travaux de KATO *et al.* (2004) montrent une situation similaire dans les sacs à jus de la mandarine Satsuma, de l'orange

Valencia et du citron de Lisbonne. Aucun signal pour le gène *Lcy-e* n'a pu être détecté par *Northern-Blot* dans les sacs à jus de ces trois espèces.

#### **IV.1.3.1. Relations entre l'expression des gènes et la différenciation phénotypique intraspécifique, exemple des oranges**

L'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* a été analysée par PCR en temps réel dans les sacs à jus de quatre oranges présentant des couleurs contrastées (*C. sinensis*, cultivars Shamouti, Sanguinelli, Cara Cara navel et Huang pi Chen) à trois stades de développement (août, novembre et février) durant la campagne 2005-2006. Les compositions en caroténoïdes ont été déterminées dans les jus de ces quatre oranges récoltées au dernier stade en février. Les profils en caroténoïdes montrent surtout des différences quantitatives. Les quatre oranges synthétisent des  $\beta,\beta$ -xanthophylles. Cependant l'orange Cara Cara navel accumule plus de carotènes que les oranges Shamouti et Sanguinelli et ces dernières concentrent surtout des  $\beta,\beta$ -xanthophylles. L'orange Huang pi Chen se distingue des autres oranges par une faible concentration en caroténoïdes totaux et une coloration jaune de la pulpe des fruits à maturité. Nous avons mis en évidence des corrélations entre les profils en caroténoïdes et les profils d'expression de certains gènes de biosynthèse.

L'abondance des transcrits du gène *Psy* en février est corrélée aux concentrations en caroténoïdes totaux. Les niveaux d'expression des gènes *Dxs* et *Psy* semblent coordonnés. Les faibles teneurs en caroténoïdes dans les jus de l'orange Huang pi Chen semblent liées à l'expression des gènes *Dxs* et *Psy* pour lesquels les quantités de transcrits en février sont significativement inférieures dans les sacs à jus de cette orange par rapport aux trois autres variétés. Pour un autre génotype qui concentre de très faibles teneurs en caroténoïdes, le citron, cultivar Lisbonne, KATO *et al.* (2004) ont montré que les quantités de transcrits du gène *Psy* sont équivalentes aux quantités mesurées dans les sacs à jus de l'orange Valencia. En revanche ces mêmes auteurs montrent que le gène *CitNced2* est surexprimé dans les sacs à jus du citron ce qui semble lié à l'absence violaxanthine, tandis qu'ils observent le phénomène inverse dans les sacs à jus de l'orange Valencia (KATO *et al.*, 2006). Ainsi, le cas de l'orange Huang pi Chen paraît différent de celui du citron de Lisbonne puisque cette orange a pour principal caroténoïde la *cis*-violaxanthine (substrat de l'enzyme NCED). La faible concentration en caroténoïdes totaux dans les jus de cette orange serait liée à une sous-expression des gènes responsables de la formation des précurseurs des caroténoïdes et du phytoène et non à la surexpression des gènes impliqués dans la dégradation de la violaxanthine. La détermination des concentrations en acide abscissique et l'analyse de

l'expression des gènes *Nced* permettraient de confirmer cette hypothèse. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence des corrélations entre l'accumulation préférentielle des carotènes (phytoène et  $\zeta$ -carotène en particulier) chez l'orange Huang pi Chen et les quantités de transcrits des gènes *Pds*, *Zds* et *Lcy-b* en février. Le profil d'expression du gène *Lcy-b* dans les sacs à jus de l'orange Huang pi Chen est différent de celui établi pour les autres oranges : nous n'avons pas relevé de variation significative dans l'abondance des transcrits de *Lcy-b* au cours du développement du fruit. L'accumulation des carotènes pourrait être liée à la sous-expression du gène *Lcy-b*. Cependant, nous n'avons pas détecté de lycopène dans les sacs à jus de cette orange et nous suggérons que d'autres mécanismes de régulation comme des phénomènes de régulation post-transcriptionnels affectant les enzymes PDS et ZDS pourraient expliquer l'accumulation préférentielle des carotènes dans les fruits de l'orange Huang pi chen. Ceci peut également être dû aux gènes codant pour la plastoquinone ou pour l'oxydase terminale plastidiale (PTOX), cofacteurs des deux désaturases. Un tel mécanisme a été mis en avant par RODRIGO *et al.* (2003) qui ont caractérisé l'orange Pinalate, mutant de l'orange Navelate et accumulant des carotènes à la place des xanthophylles dans le flavédo. Selon ces auteurs le phénotype de l'orange Pinalate résulterait d'un défaut dans l'activité de la  $\zeta$ -carotène désaturase ou d'un cofacteur de cette enzyme (plastoquinone et PTOX). AL-BABILI *et al.* (1996) ont également souligné l'importance des mécanismes de régulation post-transcriptionnels pour la phytoène désaturase dans les chromoplastes de *Narcissus pseudonarcissus*. Enfin, chez la tomate, le mutant *Ghost* dont le gène *Ptox* est non fonctionnel accumule du phytoène (FRASER et BRAMLEY, 2004).

Nous suggérons que l'augmentation de l'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Hy-b* et *Zep* au cours de la maturation des fruits favorise l'accumulation des  $\beta,\beta$ -xanthophylles dans le cas de l'orange Shamouti et de l'orange Sanguinelli. Ces résultats sont en accord avec ceux de KATO *et al.* (2004) qui ont montré l'augmentation de l'expression des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* et parallèlement l'accumulation de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la violaxanthine dans les sacs à jus de la mandarine Satsuma et de l'orange Valencia.

Nous n'avons pas pu expliquer le phénotype de l'orange Cara Cara navel, qui accumule des carotènes en plus des  $\beta,\beta$ -xanthophylles, par l'expression différentielle des gènes de biosynthèse. En effet, les niveaux d'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, et aussi des gènes *Pds*, *Zds* et *Lcy-b* dans les sacs à jus de Cara Cara ne sont pas significativement différents en février des niveaux déterminés pour les oranges Shamouti et Sanguinelli. Ainsi, la forte concentration en phytoène n'est pas due à une surexpression des gènes *Dxs* et *Psy*. Les teneurs élevées en phytoène, phytoflène et lycopène ne sont pas non plus liées à une

diminution significative de l'expression de gènes *Pds*, *Zds* et *Lcy-b*. Nous pouvons formuler l'hypothèse que l'activité des enzymes PDS, ZDS ou LCY-b est diminuée chez l'orange Cara Cara navel. Pour le gène *Lcy-b*, présent en une seule copie, nous avons voulu vérifier que ce défaut d'activité pour l'enzyme correspondante n'était pas lié à la diversité allélique. Pour ce gène, les profils RFLP et SSR sont identiques pour les quatre oranges tandis que les analyses DHPLC révèlent des différences dans la séquence codante du gène *Lcy-b* chez l'orange Huang pi Chen par rapport aux trois autres oranges qui restent elles identiques. Nous avons cloné ce gène chez les orangers et après séquençage, nous avons obtenu les deux allèles des oranges Sanguinelli et Cara Cara navel. Les deux séquences codant pour LCY-b chez l'orange Cara Cara navel sont aussi celles isolées chez l'orange Sanguinelli. Ainsi, la variabilité phénotypique entre ces deux oranges n'a pas pour origine des variations dans la séquence codante du gène *Lcy-b*. Des phénomènes post-traductionnels pourraient être à l'origine d'une variation d'activité de l'enzyme LCY-b. D'après INOUE *et al.* (2006), l'enzyme synthétisée dans le cytoplasme est transportée dans les plastes et subit des modifications. La protéine transportée a une masse moléculaire de 60 kDa tandis que la forme active extraite des chloroplastes a une masse de 45 kDa. De plus ces études *in vitro* montrent que cette enzyme peut être présente sous deux formes dans les plastes : soluble dans le stroma ou liée à la membrane des plastes (INOUE *et al.*, 2006). L'extraction et l'analyse de l'enzyme LCY-b des chromoplastes de l'orange Cara Cara navel et des trois autres oranges apporterait des informations à ce sujet. Cependant, les analyses d'activité enzymatique, relevées dans la bibliographie, utilisent des techniques relativement lourdes à mettre en œuvre comme la transformation de bactéries avec des plasmides portant les gènes de biosynthèse et l'utilisation de substrat radioactif marqué au  $^{14}\text{C}$  (AL-BABILI *et al.*, 1996 ; FRASER *et al.*, 2002 ; INOUE *et al.*, 2006). Le phénotype de l'orange Cara Cara pourrait également être lié à des mécanismes de régulation post-transcriptionnels affectant les enzymes PDS ou ZDS ou leurs cofacteurs (AL-BABILI *et al.* (1996) ; RODRIGO *et al.* (2003) ; FRASER et BRAMLEY, 2004).

#### **IV.1.3.2. Relations entre l'expression des gènes et les phénotypes au niveau interspécifique, exemple d'une orange, d'un citron et d'un pamplemousse**

Nous avons mis en évidence des profils d'expression pour les gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* plus contrastés en analysant le citron Eureka et le pamplemousse Deep Red. Les faibles concentrations en caroténoïdes totaux dans les jus du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red seraient liées aux faibles niveaux d'expression du gène *Dxs* ou du gène *Psy*. Nos résultats suggèrent que ce n'est pas seulement le niveau de transcription du

gène *Psy* qui joue un rôle important en ce qui concerne les teneurs en caroténoïdes totaux mais bien les quantités d'ARNm des deux gènes *Psy* et *Dxs*. Ces résultats sont en accord avec ceux de LOIS *et al.* (2000) sur la tomate, qui soulignent que l'étape catalysée par PSY n'est pas la première étape limitante pour la synthèse des caroténoïdes et que cette synthèse serait contrôlée par la coordination des deux gènes *Psy* et *Dxs*. Ainsi, les quantités de transcrits du gène *Psy* ne sont pas différentes dans les sacs à jus du citron Eureka et de l'orange Shamouti aux trois stades de développement des fruits. Cependant, les deux espèces présentent des différences pour l'expression du gène *Dxs* : la quantité de transcrits pour *Dxs* est 4,6 fois plus faible dans les sacs à jus du citron Eureka que dans les sacs à jus de l'orange Shamouti. Nos résultats sont en accord avec ceux de KATO *et al.* (2004) en ce qui concerne le gène *Psy* pour lequel les quantités de transcrits ne sont pas significativement différentes entre le citron de Lisbonne et l'orange Valencia. Le faible niveau d'expression des gènes *Dxs* et *Psy* (respectivement 7,8 et 2 fois moins exprimés que dans les sacs à jus de l'orange Shamouti) serait responsable de la faible concentration en caroténoïdes totaux dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red. Nous montrons ainsi les liens entre synthèse des précurseurs et synthèse des caroténoïdes dans les sacs à jus des agrumes. Par ailleurs, nous suggérons que l'accumulation des carotènes dans le pamplemousse Deep Red est corrélée négativement à l'expression des gènes *Pds*, *Zds* et *Lcy-b*. Les profils RFLP et SSR et les analyses DHPLC pour le gène *Lcy-b* nous ont conduit à suggérer un lien entre les allèles des pamplemoussiers pour ce gène et l'accumulation du lycopène au dépend des caroténoïdes situés en aval dans la chaîne de biosynthèse. Les variations dans la séquence codante du gène *Lcy-b* relevées chez le pamplemousse sans pépin par rapport à la séquence de la mandarine méditerranéenne pourraient être à l'origine d'une modification de l'activité de l'enzyme correspondante. D'après les résultats sur l'expression de ce gène chez le pamplemousse Deep Red, nous proposons également que cette diversité allélique pourrait avoir un effet sur l'expression de ce gène. La variation d'expression pour ce gène pourrait être expliquée par une variation au niveau de la séquence du promoteur. Une situation comparable a été mise en évidence par RONEN *et al.* (1999) chez un mutant de tomate appelé *Delta* qui accumule du  $\zeta$ -carotène à la place du lycopène. Ces auteurs ont isolé chez ce mutant un allèle spécifique du gène *Lcy-e* qui diffère de l'allèle du type commun au niveau de la séquence du promoteur. Le gène *Lcy-e* est surexprimé dans les fruits du mutant *Delta* tandis qu'il est très peu exprimé dans les fruits du type commun (RONEN *et al.*, 1999). Nous soulignons également les faibles variations d'expression du gène *Hy-b* et les faibles quantités d'ARNm dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red tout au long de la maturation des fruits (*Hy-b* est 13,5 fois moins exprimé dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red que dans les sacs à jus de l'orange

Shamouti). Ce profil d'expression expliquerait l'absence de  $\beta$ -cryptoxanthine dans les jus du pamplemousse Deep Red.

## IV.2. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### *Structuration de la diversité phénotypique*

Les agrumes ont des compositions complexes en caroténoïdes. Notre premier objectif était de déterminer la diversité des compositions en caroténoïdes au sein du genre *Citrus* et d'évaluer l'importance du facteur génétique. Nous avons analysé la diversité des compositions en caroténoïdes dans les jus de fruits au sein du genre *Citrus* en étudiant 25 génotypes, cultivés sur un même site, soumis aux mêmes pratiques culturales et représentant les 8 espèces cultivées d'agrumes. Nous avons mis en évidence la richesse des petits agrumes (mandarines et clémentine) produits en région méditerranéenne en  $\beta$ -cryptoxanthine (valeurs comprises entre  $9,09 \pm 0,55$  et  $17,51 \pm 0,90 \text{ mg.L}^{-1}$ ), composé responsable de la coloration orange vif et ayant plusieurs fonctions biologiques, provitamine A et antioxydant. Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'importance du facteur génétique en montrant la contribution de la variabilité génétique à la variance pour chaque composé ce qui permet d'analyser plus en détail les déterminants génétiques des compositions en caroténoïdes chez les agrumes. De plus, sur la base des compositions en caroténoïdes, nous avons montré que les 25 génotypes sont répartis en trois groupes qui correspondent aux trois taxons de base (*C. reticulata*, *C. medica* et *C. maxima*) et que cette classification est en accord avec les organisations précédemment établies avec des marqueurs moléculaires neutres. Ainsi nous avons suggéré que l'évolution des agrumes est le principal facteur d'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes des fruits. L'étude de l'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes au sein du genre *Citrus* nous a également permis de proposer quelles sont les étapes de la voie de biosynthèse qui semblent impliquées dans la différenciation des phénotypes caractéristiques des trois groupes précédemment distingués. Les mécanismes de régulations de la voie de biosynthèse ont ensuite été étudiés prioritairement à ces étapes catalysées par PSY, LCY-b, LCY-e, HY-b et ZEP.

### *Diversité allélique des gènes de la chaîne de biosynthèse*

Notre deuxième objectif était d'étudier les bases moléculaires à l'origine de la diversité des compositions en caroténoïdes précédemment établies en analysant le polymorphisme des gènes de la chaîne de biosynthèse entre les différentes espèces de *Citrus*. Nous avons étudié le polymorphisme des fragments d'ADN porteurs des gènes de biosynthèse entre les 25 génotypes précédemment caractérisés phénotypiquement par des analyses RFLP et SSR. Le nombre de copies des gènes *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep* a été déterminé dans le génome des espèces du genre *Citrus* et nous avons pu étudier les liens entre diversité phylogénétique de ces gènes et diversité phénotypique. Le phénotype des pamplemousses et



pomelos, avec une limitation de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes à l'étape catalysée par LCY-b, pourrait être liée à une variabilité allélique du gène *Lcy-b*. Le phénotype des mandarines, oranges et clémentine, espèces produisant des  $\beta,\epsilon$ -xanthophylles à côté des  $\beta,\beta$ -xanthophylles semble être dû à la variabilité allélique du gène *Lcy-e*. Cependant, pour les autres étapes clés catalysées par PSY, HY-b et ZEP, le polymorphisme révélé par les analyses RFLP et SSR dans les séquences des gènes codant pour ces enzymes, n'a pas permis d'expliquer le phénotype des agrumes acides ainsi que l'accumulation massive des  $\beta,\beta$ -xanthophylles ( $\beta$ -cryptoxanthine et violaxanthine) pour les génotypes du groupe des mandarines.

L'étude de la variabilité de la séquence codante du gène *Lcy-b* par DHPLC a confirmé la différenciation interspécifique suggérée par les marqueurs RFLP et SSR. De même, le polymorphisme mis en évidence dans ou autour des séquences des autres gènes de biosynthèse (*Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-e*, *Hy-b* et *Zep*) doit être confirmé sur un échantillon variétal plus large et par des méthodes permettant de détecter des variations dans les séquences codantes. Dans un premier temps, des analyses permettant de mettre en évidence du polymorphisme sur un grand nombre d'individus comme des analyses *Ecotilling*, *DHPLC* ou *SSCP* pourraient être envisagées. En effet, grâce à ces méthodes, des substitutions ou délétions d'un seul nucléotide peuvent être détectées. Dans un deuxième temps, un clonage et séquençage de tous les allèles chez des génotypes présentant du polymorphisme seraient nécessaires. Le séquençage permettra de mettre en évidence les variations au niveau de la séquence génomique (exoniques et introniques) et permettra de prédire les modifications au niveau de la chaîne des acides aminés.

Nous avons réalisé le clonage et séquençage du gène monolocus *Lcy-b* dans un premier temps chez un représentant de chacun des trois taxons de base et chez les orangers. Les analyses RFLP et SSR avaient démontré l'hétérozygotie phylogénétique des orangers pour ce gène (pamplemoussier/mandarinier) mais ne révélaient pas de polymorphisme intervariétal. Toutefois les analyses DHPLC témoignaient d'une variabilité de la séquence codante entre trois de ces orangers (Shamouti, Cara Cara, Sanguinelli) et une orange très pauvre en caroténoïdes, l'orange Huang pi Chen. Le séquençage du gène *Lcy-b* a permis de confirmer l'hypothèse sur l'homozygotie des taxons de base pour ce gène (seul le pamplemousse sans pépin présente une hétérozygotie limitée à deux bases) et l'hétérozygotie des orangers qui présentent un allèle identique à l'allèle de pamplemoussier et un allèle identique à l'allèle de mandarinier. L'allèle de pamplemoussier pourrait être impliqué dans une variation de l'activité de l'enzyme LCY-b. Etant donné que l'oranger Cara Cara présente un allèle de

pamplemoussier et un allèle de mandarinier comme les autres orangers, le phénotype de cette orange (accumulation préférentielle des carotènes) ne paraît alors pas lié à la diversité allélique du gène *Lcy-b*. Ces analyses devraient être étendues à un échantillon plus large surtout pour les espèces *C. maxima* et *C. paradisi* pour lesquelles des structures génotypiques particulières ont été mises en évidence pour le gène *Lcy-b* et qui pourraient être impliquées dans l'arrêt de la chaîne de biosynthèse et l'accumulation du lycopène. De plus nous avons montré que l'expression du gène *Lcy-b* varie peu dans les sacs à jus du pamplemousse Deep Red au cours de la maturation des fruits et reste à un faible niveau. L'étude de la séquence génomique de ce gène et de ses séquences promotrices chez les pamplemoussiers et pomelos permettrait de préciser la régulation liée à ce polymorphisme. Une autre approche serait l'étude de populations hybrides obtenues à partir d'un génotype accumulant du lycopène et d'un autre génotype accumulant des xanthophylles comme les mandarines, clémentine ou oranges et la recherche de QTLs. Il serait intéressant de localiser le gène *Lcy-b* sur une carte génétique et de confronter la localisation du gène candidat et celle des QTLs.

#### *Diversité d'expression des gènes de la chaîne de biosynthèse*

Chez la tomate, fruit climactérique et servant de modèle pour le processus de développement des fruits et de la maturation, les variations de couleur semblent majoritairement liées à des modifications d'expression génique. Notre troisième objectif était ainsi d'analyser le niveau d'expression des principaux gènes de biosynthèse des caroténoïdes chez différentes variétés d'une même espèce et chez au moins une espèce de chacun des trois groupes précédemment établis. Nous avons analysé le niveau d'expression des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Lcy-b*, *Hy-b* et *Zep* et les différences inter et intraspécifiques. Le niveau d'expression des gènes joue un rôle important dans la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes dans les sacs à jus des agrumes. L'augmentation des quantités de transcrits des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Hy-b* et *Zep* s'accompagne de l'accumulation des  $\beta,\beta$ -xanthophylles dans les sacs à jus des oranges Shamouti et Sanguinelli. De plus, la faible concentration en caroténoïdes totaux dans les sacs à jus de l'orange Huang pi Chen serait liée à une sous-expression des gènes *Dxs* et *Psy* chez cette orange par rapport aux niveaux d'expression relevés dans les oranges Shamouti, Sanguinelli et Cara Cara. La sous-expression du gène *Dxs* ou du gène *Psy* semble aussi influencer les faibles teneurs en caroténoïdes totaux dans les sacs à jus du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red. Ainsi, l'étape catalysée par PSY ne serait pas la première étape limitante dans la synthèse des caroténoïdes chez les agrumes. L'expression du gène *Dxs*, codant pour une enzyme catalysant la première étape de la voie du MEP influencerait la synthèse des caroténoïdes et serait coordonnée avec celle du gène *Psy*. De plus, le polymorphisme dans la séquence du gène *Lcy-b* précédemment mis en évidence

pourrait aussi être à l'origine de la sous-expression de ce gène chez les pamplemoussiers et pomelos et de l'accumulation du lycopène dans les sacs à jus de ces derniers. Enfin, l'absence de  $\beta$ -cryptoxanthine dans les jus des pamplemousses semble due à la sous-expression du gène *Hy-b*.

#### *Relations entre la biosynthèse de l'acide abscissique et les teneurs en caroténoïdes*

Notre travail n'a pas abordé l'étude de l'acide abscissique qui est un composé majeur du catabolisme des caroténoïdes. Cette hormone joue un rôle fondamental dans la maturation des graines et dans la transduction du signal permettant la régulation des flux d'eau par la fermeture des stomates. L'acide abscissique est formé à partir de la dégradation de la *cis*-violaxanthine ou de la *cis*-néoxanthine par l'action de la 9-*cis*-époxy hydroxy caroténoïde dioxygénase (NCED). Dans notre étude, nous avons également formulé deux hypothèses sur les différences interspécifiques au niveau de l'accumulation des caroténoïdes et la dégradation de la *cis*-violaxanthine pour la synthèse de l'acide abscissique : (1) la faible concentration en caroténoïdes totaux des jus de l'orange Huang pi Chen ou du pamplemousse Deep Red serait liée à la sous-expression des gènes *Dxs* et *Psy* et non à la dégradation de la *cis*-violaxanthine pour la synthèse de l'acide abscissique ; (2) le phénotype du citron Eureka serait associé à la sous-expression du gène *Dxs* et à la surexpression de *Nced*. Une étude de la synthèse de l'acide abscissique et de l'expression des gènes *Nced* chez des variétés d'agrumes représentant les trois taxons de base est nécessaire pour confirmer ces hypothèses. Par ailleurs, les hormones (éthylène, gibbérellines et acide abscissique) contrôlent le développement, la maturation et l'abscission des fruits. Des traitements avec de l'éthylène ou les gibbérellines sont utilisés pour modifier la coloration de la peau des agrumes. L'éthylène favorise la transformation des chloroplastes en chromoplastes et entraîne ainsi une modification de la couleur des fruits. A l'inverse, les traitements avec les gibbérellines retardent le changement de couleur de la peau des agrumes. Les résultats de RODRIGO *et al.* (2006) suggèrent aussi qu'un traitement à l'éthylène favorise la synthèse de l'acide abscissique et augmente l'expression des gènes *Nced* dans le flavédo de l'orange Navelate. Cependant, les mécanismes de régulation sont complexes et nous manquons d'information sur la production endogène de ces hormones chez les agrumes, fruits non climactériques, et leur rôle sur la coloration des fruits et en particulier sur la coloration de la pulpe.

#### *Etude de l'accumulation des caroténoïdes chez les espèces riches en micronutriments dans des situations de stress : étude des facteurs environnementaux*

Nous avons montré que le facteur génétique est un élément majeur de la diversité des compositions en caroténoïdes de la pulpe des agrumes ; les autres facteurs comme l'origine

géographique ou les pratiques culturelles étant minimisés. En revanche, nous n'avons pas abordé dans ce travail les facteurs de régulation exogènes (température, lumière, etc.). Nous savons que la température joue un rôle important dans la coloration des agrumes, comme en témoignent les oranges produites en climat tropical qui restent vertes à maturité. Les oranges des zones méditerranéennes sont plus riches en caroténoïdes totaux que les oranges issues des zones tropicales et subtropicales. La coloration de la peau des fruits dépend de la dégradation des chlorophylles et de la synthèse des caroténoïdes. Ces deux processus seraient eux-mêmes influencés par le froid, la lumière et l'éthylène. Dans les feuilles, l'augmentation de l'expression du gène *CsNced1* et la synthèse de l'acide abscissique peuvent être induits par un stress hydrique (RODRIGO *et al.*, 2006). Des travaux chez la tomate montrent que plusieurs loci en plus de ceux des gènes de biosynthèse des caroténoïdes jouent un rôle dans la diversité des compositions en caroténoïdes des fruits. Les études chez la tomate suggèrent que des gènes impliqués dans la transduction du signal lumineux influencent la synthèse des caroténoïdes : gènes *LeCOPILIKE* (numéro d'accension GenBank AW525993) et *LeHY5* (numéro d'accension GenBank AI897283) (LIU *et al.*, 2004).

L'étude du rôle des facteurs environnementaux peut être réalisée par l'analyse de l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes, des gènes responsables de la synthèse des précurseurs, des gènes impliqués dans la formation de l'acide abscissique dans des conditions de stress (hydriques, salins), des gènes responsables de la transduction du signal lumineux, etc. La quantification des transcrits par puces à ADN permet l'analyse simultanée de l'expression de centaines voire de milliers de gènes. L'utilisation de tels outils faciliterait l'analyse de l'impact environnemental sur l'accumulation des caroténoïdes dans la pulpe des fruits.

## **V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- AL BABILI, S.; HUGUENEY, P.; SCHLEDZ, M.; WELSCH, R.; FROHNMEYER, H.; LAULE, O.; BEYER, P. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. FEBS Lett. 2000, 485, p. 168-172.
- AL BABILI, S.; LINTIG, J. V.; HAUBRUCK, H.; BEYER, P. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplast is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. Plant J. 1996, 9, p. 601-612.
- ALBERTINI, M. V.; CARCOUET, E.; PAILLY, O.; GAMBOTTI, C.; LURO, F.; BERTI, L. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. J. Agric. Food Chem. 2006, 18, p.8335-8339.
- ALBRECHT, M.; SANDMANN, G. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. Plant Physiol. 1994, 105, p. 529-534.
- ALOS, E.; CERCOS, M.; RODRIGO, M.J.; ZACARIAS L.; TALON, M. Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, p. 4888-4895.
- BAIN, J. M. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Aust. J. Bot., 1958, 6, p. 1-24.
- BANDO, N.; HAYASHI, H.; WAKAMATSU, S.; INAKUMA, T.; MIYOSHI, M.; NAGAO, A.; YAMAUCHI, R.; TERAOKA, J. Participation of singlet oxygen in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary  $\beta$ -carotene an ex vivo study. Free Radic. Biol. Med. 2004, 11, p. 1854-1863.
- BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theor. Appl. Genet. 2006, 112 (8), p. 1519-1531.
- BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P. A. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. J. Biol. Chem. 1993, 268 (34), p. 25718-25721.
- BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P. A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. Plant Cell. 1995, 7, p. 1027-1038.
- BARRET, H. C.; RHODES, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. Sytem. Bot. 1976, 1, p. 105-136.
- BEIDLER, J. L.; HILLIARD, P. R.; RILL, R. L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. Anal. Biochem. 1982, 126, p. 374-380.
- BOUVIER, F.; BACKHAUS, R. A.; CAMARA, B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. J. Biol. Chem. 1998c, 273, p. 30651-30659.
- BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). Sci. 2003a, 300, p. 2089-2091.

- BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; BACKHAUS, R. A.; KUMAGAI, M. H.; CAMARA, B. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, p. 6346-6352.
- BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; HUGUENEY, P.; MARIN, E.; MARION-POLL, A. ; CAMARA, B. Xanthophyll biosynthesis: Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of b-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*) *J. Biol. Chem.* 1996, 271, p. 28861-28867.
- BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; SUIRE, C.; BACKHAUS, R. A.; CAMARA, B. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* 1998a, 117, p. 1423-1431.
- BOUVIER, F.; KELLER, Y.; D'HARLINGUE, A.; CAMARA, B. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochem. Biophys. Acta.* 1998b, 1391, p. 320-328.
- BOUVIER, F.; SUIRE, C.; MUTTERER, J.; CAMARA, B. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell.* 2003b, 15, p. 47-62.
- BOTELLA-PAVIA, P.; BESUMBES, O.; PHILLIPS, M. A.; CARRETERO-PAULET, L.; BORONAT, A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* 2004, 40, p. 188-199.
- BOTELLA-PAVIA, P.; RODRIGUEZ-CONCEPTION, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol. Plant.* 2006, 126, p. 369-381.
- BRAMLEY, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 2002, 53, p. 2107-2113.
- BRITTON, G.; LIAANEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy; Birkhäuser: Basel, Switzerland, 1995.
- BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. *Plant J.* 1999, 17, p. 427-431.
- BUSCH, M.; SEUTER, A.; HAIN, R. Functional analysis of the early Steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 2002, 128, p. 439-453.
- CAMARA, B.; BRANGEON, J. Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annuum* fruit. *Planta.* 1981, 151, p. 359-364.
- CHANDLER, L. A.; SCHWARTZ, S. J. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 1987, 52, p. 669-672.
- CHEN, H. C.; KLEIN, A.; XIANG, M.; BACKHAUS, R. A.; KUNTZ, M. Drought- and wound-induced expression in leaves of gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *Plant J.* 1998, p. 317-326.

- CHEUNG, A. Y.; MCNELLIS, T.; PIEKOS, B. Maintenance of chloroplast components during chromoplast differentiation in the tomato mutant green flesh. *Plant Physiol.* 1993, 101, p. 1223-1229.
- CORONA, V.; ARACCI, B.; KOSTURKOVA, G.; BARTLEY, G. E.; PITTO, L.; GIORGETTI, L.; SCOLNIK, P. A.; GIULIANO, G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J.* 1996, 9, p. 505-512.
- CORTES, C.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A.; TORREGROSA, F. Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, p. 2203-2212.
- CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 1998, 49, p. 557-583.
- CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98, p. 2905-2910.
- CUNNINGHAM, F. X.; CHAMOVITZ, D.; MISAWA, N.; GANTT, E.; HIRSCHBERG, J. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of beta-carotene. *FEBS Lett.* 1993, 328, p. 130-138.
- CUNNINGHAM, F. X.; POGSON, B. J.; SUN, Z.; MCDONALD, K. A.; DELLAPENNA, D.; GANTT, E. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell.* 1996, 8, p. 1613-1626.
- DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. *Citrus*. In *Crop production science in horticulture*, CAB INTERNATIONAL; Wallingford, UK, 1994; p. 202-254.
- DEMMING-ADAMS, B.; GILMORE, A. M.; ADAMS, W. W. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB. J.* 1996, 10, p. 403-412.
- DERUERE, J.; ROMER, S.; D'HARLINGUE, A.; BACKHAUS, R. A.; KUNTZ, M.; CAMARA, B. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell.* 1994, 6, p. 119-133.
- DHUIQUE-MAYER, C.; CARIS-VEYRAT, C.; OLLITRAULT, P.; CURK, F.; AMIOT, M.-J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, p. 2140-2145.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin* 1987, 19, p. 11-15.
- EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* 2001, 6, p. 78-84.
- EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D.; ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol. Life Sci.* 2004, 61, p. 1401-1426.



- ENFISSI, E. M. A.; FRASER, P. D.; LOIS, L. M.; BORONAT, A.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 2005, 3, p. 17-27.
- ESEN, A.; SOOST, R. K. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo endosperm ploidy ratios in Citrus. In: *Actos del I congreso mundial de citrucultura*, Murcia, Spain. 1973, p. 53-63.
- FEDERICI, C. T.; FANG, D. Q.; SCORA, R. W.; ROOSE, M. L. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 1998, 96, p. 812-822.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 2004, 43, p. 228-265.
- FRASER, P. D.; ROMER, S.; SHIPTON, C. A.; MILLS, P. B.; KIANO, J. W.; MISAWA, N.; DRAKE, R. G.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoène synthase in a fruit specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99, p. 1092-1097.
- FRASER, P. D.; TRUESDALE, M. R.; BIRD, C. R.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 1994, 105, p. 405-413.
- FRAY, R. G.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 1993, 22, p. 589-602.
- FRAY, R. G.; WALLACE, A.; FRASER, P. D.; VALERO, D.; HEDDEN, P.; BRAMLEY, P. M.; GRIERSON, D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellins pathway. *Plant J.* 1995, 8, p. 693-701.
- FREY-WYSSLING, A.; SCHWEGLER, F. Ultrastructure of the chromoplasts in the carrot root. *J. Ultrastruct. Res.* 1965, 13, p. 543-559.
- GALLAGHER, C. E.; MATTHEWS, P. D.; LI, F. Q.; WURTZEL, E. T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiol.* 2004, 135 (3), p. 1776-1783.
- GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: identification and quantification by HPLC. *Food Research International.* 2005, 38, p. 899-903.
- GARNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; MCPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* 2000, 68, p. 471-474.
- GIULIANO, G.; BARTLEY, G. E.; SCOLNICK, P. A. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Cell.* 1993, 5, p. 379-387.

- GOLDSCHIMDT, E. E.; HUBERMAN, M.; GOREN, R. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of Citrus fruit with ethylene antagonists. *Plant Growth Reg.* 1993, 12, p. 325-329.
- GOODNER, K. L.; ROUSEFF, R. L.; HOFSSOMMER, H. J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, p. 1146-1150.
- GREEN, R. M.; VARDI, A.; GALUN, E. The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 1986, 72, p. 170-177.
- GROSS, J. *Pigments in fruits*; Harcourt Brace Javanovich: London, U. K., 1987.
- GROSSER, J. W.; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. 2000. Somatic hybridization in Citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 2000, 36, p. 434-449.
- HARRIS, W. M.; SPURR, A. R. Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am. J. Bot.* 1969, 56, p. 380-389.
- HENRY, L. K.; PUSPITASARI-NIENABER, N. L.; JAREN-GALAN, M.; VAN BREEMEN, R. B.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, p. 5008-5013.
- HERRERO, R.; ASINS, M. J.; CARBONELL, E. A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 1. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 1996, 92, p. 599-609.
- HERRERO, R.; ASINS, M. J.; PINA, J. A.; CARBONELL, E. A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 2. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 93, p. 1327-1334.
- HIRAI, M.; KOZAKI, I. Isozymes of citrus leaves. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1981, 1, p. 10-13.
- HIRSCHBERG, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001, 4, p. 210-218.
- HUGUENEY, P.; BODILLO, A.; CHEN, H. C.; KLIEN, A.; HIRSCHBERG, J.; CAMARA, B. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J.* 1995, 8, p. 417-424.
- HUYSKENS, S.; TIMBERG, R.; GROSS, J. Pigment and plastid ultrastructural changes in kumquat (*Fortunella margarita*) "Nagami" during ripening. *J. Plant. Physiol.* 1985, 118, p. 61-72.
- IGLESIAS, D. J. ; TADEO, F. R. ; LEGAZ, F. ; PRIMO-MILLO, E. ; TALON, M. In vivo sucrose stimulation of colour change in Citrus fruits epicarps : Interaction between nutritional and hormonal signals. *Physiol. Plant.* 2001, 112, p. 244-250.

- IKOMA, Y.; KOMATSU, A.; KITA, M.; OGAWA, K.; OMURA, M.; YANO, M.; MORIGUCHI, T. Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol. Plant.* 2001, 111, p. 232-238.
- IMBERT, E. Panorama du marché mondial des agrumes frais et transformés. *Fruitrop.* 2006a, p. 130.
- IMBERT, E. Prévisions campagne d'agrumes 2006-2007. *Fruitrop.* 2006b, 139, p. 4-10.
- INOUE, K. Carotenoid hydroxylation-P450 finally ! *Trend Plant Sci.* 2004, 9, p. 515-517.
- INOUE, K.; FURBEE, K. J.; URATSU, S.; KATO, M.; DANDEKAR, A. M.; IKOMA, Y. Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. *Physiol. Plant.* 2006, 127 (4), p. 561-570.
- ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell.* 2002, 14, p. 333-342.
- IUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2001, 27, p. 325-333.
- KASAHARA, H.; HANADA, A.; KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, p. 45188-45194.
- KATO, M.; IKOMA, Y.; MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HYODO, H.; YANO, M. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.* 2004, 134, p. 1-14.
- KATO, M.; MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; OKUDA, H.; YANO, M. The role of carotenoid cleavage dioxygenase in the regulation of carotenoid profiles during maturation in Citrus fruit. *J. Exp. Bot.* 2006, 57, p. 2153-2164.
- KENNEDY, T. A.; LIEBLER, D. C. Peroxyl radical oxidation of  $\beta$ -carotene: formation of  $\beta$ -carotene epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* 1991, 4, p. 290-295.
- KIM, I.-J.; KO, K.-C.; KIM, C.-S.; CHUNG, W.-I. Isolation and characterization of cDNA encoding  $\beta$ -carotene hydroxylase in Citrus. *Plant Sci.* 2001, 161, p. 1005-1010.
- KITA, M.; KOMATSU, A.; OMURA, M.; YANO, M.; IKOMA, Y.; MORIGUCHI, T. Cloning and expression of CitPDS1, a gene encoding phytoene desaturase in Citrus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001, 65, p. 1424-1428.
- KRINSKY, N. Y. Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. of Nutr.* 1993, 13, p. 561-587.
- KRUG, C. A. Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae, with special reference in the genus Citrus. *Citrus Bot. Gaz.* 1943, 104, p. 602-611.

- LANGE, B. M.; GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol. Biol.* 2003, 51, p. 925-948.
- LANGE, B. M.; WILDUNG, M. R.; MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95, p. 2100-2104.
- LAULE, O.; FÜRHOHLZ, A.; CHANG, H.-S.; ZHU, T.; WANG, X.; HEIFETZ, P. B.; GRUISSEM, W.; LANGE, B. M. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis Thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100, p. 6866-6871.
- LEE, H. S. Characterization of carotenoids in juice of red Navel orange (Cara Cara). *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, p. 2563-2568.
- LEE, H. S.; CASTLE, W. S. Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd Blood orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, p. 877-882.
- LEE, H. S.; CASTLE, W. S.; COATES, G. A. High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *J. Chromatogr. A.* 2001, 913, p. 371-377.
- LEE, H. S.; COATES, G. A. Characterization of color fade during frozen storage of red grapefruit juice concentrates. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, p. 3988-3991.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscissic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998, 49, p. 199-222.
- LICHTENTHALER, H. K. The 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999, 50, p. 47-65.
- LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M.; SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 1997, 101, p. 643-652.
- LINDGREN, L. O.; STALBERG, K. G.; HÖGLUND, A. S. Seed-specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, abscissic acid. *Plant Physiol.* 2003, 132, p. 779-785.
- LINTIG, J. VON; WELSCH, R.; BONK, M.; GIULIANO, G.; BATSCHAUER, A.; KLEINIG, H. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 1997, 12, p. 625-634.
- LIU, Y. S.; ROOF, S.; YE, Z. B.; BARRY, C.; TUINEN, A. VAN; VREBALOV, J.; BOWLER, C.; GIOVANNONI, J. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, p. 9897-9902.

- LOIS, L. M.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; GALLEG0, F.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. Carotenoid biosynthesis during fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* 2000, 22 (6), p. 503-513.
- LURO, F.; RIST, D.; OLLITRAULT, P. Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. *Acta Horticulturae.* 2001,546, p. 237-242.
- MALIK, M. N.; SCORA, R. W.; SOOST R. K. Studies of the origin of the lemon. *Hilgardia.* 1974, 42, p. 361-382.
- MANAC'H, N.; KUNTZ, M. Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events. *Plant Physiol. Biochem.* 1999, 37, p. 859-868.
- MANDEL, M. A.; FELDMANN, K. A.; HERRERA-ESTRELLA, L.; ROCHA-SOSA, M.; LEON, P. CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 1996, 9, p. 649-658.
- MANNING, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.* 1991, 195, p. 45-50.
- MARIN, E.; NUSSAUME, L.; QUESADA, A.; GONNEAU, M.; SCOTTA, B.; HUGUENEY, P.; FREY, A.; MARION-POLL, A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana glauca*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 1996, 15, p. 2331-2342.
- MARTY, I.; BUREAU, S.; SARKISSIAN, G.; GOUBLE, B.; AUDERGON, J. M.; ALBAGNAC, G. Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *J. Exp. Bot.* 2005, 56, p. 1877-1886.
- MATTHEWS, P. D.; LUO, R. B.; WURTZEL, E. T. Maize phytoene desaturase and zeta -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* 2003, 54 (391), p. 2215-2230.
- MAYNE S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.* 2003, 133 (3S), p. 933-940.
- MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* 1995, 7, p. 1015-1026.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Identification of isolutein (lutein epoxide) as cis-antheraxanthin in orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2005a, 53, p. 9369-9373.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Identification of zeinoxanthin in orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2005b, 53, p. 6362-6367.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, p. 4219-4224.

- MINGUEZ-MOSQUERA, M.; HONERO-MENDEZ, D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red pepper (*capsicum annum* L.), paprika, and oleoresin by reverse phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, p. 1616-1620.
- MINGUEZ-MOSQUERA, M.; HONERO-MENDEZ, D.; PEREZ-CALVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*; W. Jeffrey Hurst ed.; Pennsylvania, United-State; CRC PRESS, 2002, 400 p.
- MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; LAPIERRE, L.; CORSETTI, J. Differentiation of several geographical origins in single-strength Valencia orange juices using quantitative comparison of carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, p. 4038-4045.
- MULLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Phys.* 2001, 125, p. 1558-1566.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LAMALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 2000, 100, p. 1155-1166.
- OEFFNER, P.J.; UNDERHILL, P.A. DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Current Protocols in Human Genetics*. Wiley & Sons, New York, Supplement. 1998. 19:7, 10, p. 1-7.
- OKADA, K.; SAITO, T.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; KAMIYA, Y. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000, 122, p. 1045-1056.
- OLLITRAULT, P.; DE ROCCA SERRA, D. L'amélioration des agrumes : I- Les ressources génétiques. *Fruits, Numéro spécial Agrumes*. 1992a, p. 115-123.
- OLLITRAULT, P.; DE ROCCA SERRA, D. L'amélioration des agrumes : II- Créations variétales et biotechnologies. *Fruits, Numéro spécial Agrumes*. 1992b, p. 124-134.
- OLLITRAULT, P., FAURE, X., NORMAND, F. Citrus rootstocks characterization with dark and leaf isozymes : application for distinguishing nucellar from zygotic trees. In : VIIIth International Citrus Congress, 1992c, p. 13-36.
- OLLITRAULT, P.; JAQUEMOND, C.; DUBOIS, C.; LURO, F. Les agrumes. In : *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*, CIRAD. 1999, p. 89-111.
- OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; FROELICHER, Y.; LURO, F.; COTTIN, R. La diversité des agrumes: structuration et exploitation par hybridation somatique. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 2000, 86, p. 197-221.
- OLSEN, J. A. Provitamin A function of carotenoid. The conversion of beta-carotene into vitamin A. *J. Nutr.* 1989, 119, p. 105-108.
- PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 1996, 10, p. 542-551.
- PECKER, I.; CHAMOVITZ, D.; LINDEN, H.; SANDMANN, G.; HIRSCHBERG, J. A single polypeptide catalysing the conversion of phytoene to  $\zeta$ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89, p. 4962-4966.

- PECKER, I.; GUBBAY, R.; CUNNINGHAM, F. X.; HIRSCHBERG, J. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 1996, 30, p. 806-819.
- PEREZ, L. M.; LOZADA, R.; CORI, O. Biosynthesis of allylic isoprenoid pyrophosphates by an enzyme preparation from the flavedo of *Citrus paradisi*. *Phytochem.* 1983, 22, p. 431-433.
- POTTY, H. G. Occurrence and properties of enzymes associated with mevalonic acid synthesis in the orange. *J. Food Sci.* 1969, 34, p. 231-234.
- POTTY, V. H.; BRUEMMER, J. H. Mevalonate-activating enzymes in the orange. *Phytochem.* 1970a, 9, p. 99-105.
- POTTY, V. H.; BRUEMMER, J. H. Formation of isoprenoid pyrophosphates from mevalonate by orange enzymes. *Phytochem.* 1970b, 9, p. 1229-1237.
- PRALORAN, J. C. Les agrumes, techniques agricoles et production tropicale ; Coste, R., Ed. ; Maisonneuve et Lacoste : Paris, France, 1971.
- PUPIN, A.; DENNIS, M.; TOLEDO, M. HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chem.* 1999, 64, p. 269-275.
- ROBERT, B.; HORTON, P.; PASCAL, A. A.; RUBAN, A. V. Insights in the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins in vivo. *Trends Plant Sci.* 2004, 9, p. 385-390.
- RODRIGO, M. J.; ALQUEZAR, B.; ZACARIAS, L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Exp. Bot.* 2006, 57, p. 633-643.
- RODRIGO, M. J.; MARCOS, J. F.; ALFEREZ, F.; MALLENT, M. D.; ZACARIAS, L. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J. Exp. Bot.* 2003, 383, p. 727-738.
- RODRIGO, M. J.; MARCOS, J. F.; ZACARIAS, L. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, p. 6724-6731.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Some physicochemical properties of carotenoids. In *A guide to carotenoid analysis in foods*; ILSI Press; Washington D. C., United States, 1999, p. 14-22.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 2002, 130, p. 1079-1089.
- RODRIGUEZ-CONCEPTION, M.; AHUMADA, I.; DIEZ-JUEZ, E.; SAURET-GUETO, S.; LOIS, L. M.; GALLEGU, F.; CARRETERO-PAULET, L.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J.* 2001, 27, p. 213-222.

- RODRIGUEZ-CONCEPTION, M.; QUEROL, J.; LOIS, L. M.; IMPERIAL, S.; BORONAT, A. Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (GCPE) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit. *Planta*. 2003, 217, p. 476-482.
- RHOMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Report*. 1999, 16, p. 565-574.
- RHOMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B.; SAHM, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J*. 1993, 295, p. 517-524.
- ROMER, S.; HUGUENEY, P.; BOUVIER, F.; CAMARA, B.; KUNTZ, M. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1993, 196 (3), p. 1414-1421.
- RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97, p. 11102-11107.
- RONEN, G.; COHEN, M.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J*. 1999, 17, p. 341-351.
- ROUSEFF, R.; RALEY, L. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *J. Agric. Food Chem*. 1996, 44, p. 2176-2181
- SAMBROOK, J.; FITSH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor; NY, 1989.
- SAMSON, J. A. *Citrus*. In. *Tropical fruits*, second edition; Longman Group UK. Ltd., Essex, UK, 1986; p. 73-138.
- SANCHEZ-MORENO, C.; PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, P.; Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric*. 2003, 83, p. 430-439.
- SANDMANN, G.; ROMER, S.; FRASER, P. D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering*. 2006, 8, p. 291-302.
- SCHWARTZ, S. H.; QIN, X. Q.; ZEEVAART, J. A. D. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem*. 2001, 276, p. 25208-25211.
- SCHWARTZ, S.H.; TAN, B. C.; GAGE, D. A.; ZEEVAART, J. A. D.; MCCARTY, D. R. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Sci*. 1997, 276, p. 1872-1874.
- SIMKIN, A. J.; SCHWARTZ, S. H.; AULDRIDGE, M.; TAYLOR, M. G.; KLEE, H. J. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J*. 2004, 40, p. 882-892.



- SIMKIN, A. J.; ZHU, C. F.; KUNTZ, M.; SANDMANN, G. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J. Plant Physiol.* 2003, 160, p. 439-443.
- SITTE, P.; FALK, H.; LIEDVOGEL, B. Chromoplasts. In *Pigments in plants*, 2nd ed.; Czygan, F.-C., ed.; Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, Germany, 1980, p. 117-148.
- SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. Fruit development and maturation. In *Biology of Citrus*, Cambridge University Press, ed.; New York, USA, 1996, 240 p.
- STACE, H. M.; ARMSTRONG, J. A.; JAMES, S. H. Cytoevolutionary patterns in Rutaceae. *Pl. Syst. Evol.* 1993, 187, p. 1-28.
- STRATTON, S. P.; SCHAEFER, W. H.; LIEBER, D. C. Isolation and identification of singlet oxygen products of  $\beta$ -carotene. *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 4, p. 542-547.
- SWINGLE, W. T. The botany of Citrus and its wild relatives in the orange subfamily. In *The citrus industry*, vol. 1; Webber H. J., Batchelor D. L. (eds); University of California, Berkeley, 1943, p. 128-474.
- SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In *The citrus industry*. 1. History, world distribution, botany and varieties; W. Reuther *et al.* éd.; Berkeley, États-Unis, University of California Press, 1967, p. 190-430.
- TAO, N.; HU, Z.; LIU, Q.; XU, J.; CHENG, Y.; GUO, L.; GUO, W.; DENG, X. Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep.* 2007, DOI 10.1007/s00299-006-0289-0.
- TAN, B. C.; JOSEPH, L. M.; DENG, W. T.; LIU, L. J.; LI, Q. B.; CLINE, K.; MCCARTY, D. R. Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* 2003, 35, p. 44-56.
- TANAKA, T. Fundamental discussion of Citrus classification. *Stud. Citrologia*, 1977, 14, p. 1-6.
- TORRES, A. M.; SOOST, R. K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *Am. J. Bot.* 1979, 65, p. 869-881.
- VAN DEN BERG H., FAULKS R., FERNANDO GRANADO H., HIRSCHBERG J., OLMEDILLA B., SANDMANN G., SOUTHON S. ET STAHL W. The potential for improvement of carotenoid levels in foods and the likely systematic effects. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, p. 880-912.
- VAN VLIET, T.; VAN SCHAIK, F.; SCHREURS, W. H. P.; VAN DEN BERG, H. In vitro measurement of  $\beta$ -carotene cleavage activity : methodological considerations and the effect of other carotenoids on  $\beta$ -carotene cleavage. *J. Vit. Nutr. Res.* 1996, 66, p. 77-85.
- VASQUEZ-CAICEDO, A. L.; HELLER, A.; NEIDHART, S.; CARLE, R. Chromoplast morphology and  $\beta$ -carotene accumulation during postharvest ripening of mango cv. 'Tommy Atkins'. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, p. 5769-5776.
- VISHNEVETSKY, M.; OVADIS, M.; ZUKER, A.; VAINSTEIN, A. Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast : multilevel regulation of carotenoid-associated genes. *Plant J.* 1999, 20, p. 423-431.

WELSCH, R.; MEDINA, J.; GIULIANO, G.; BEYER, P.; LINTIG, J. VON. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2003, 216, p. 523-534.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (10), p. 8588-8596.

YAMAUCHI, R.; MIYAKE, N.; INOUE, H.; KATO, K. Products formed by peroxy radical oxidation of  $\beta$ -carotene. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, p. 708-713.

YAMAUCHI, R.; TSUCHIHASHI, K.; KATO, K. Oxidation products of beta-carotene during the peroxidation of methyl linoleate in the bulk phase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, p. 1301-1306.

YANO, M. Cancer prevention by Citrus. *J. Jpn. Soc. Food Sci. chem.* 1999, 47, p. 128-135.

## **VI. ANNEXES**

## Effects of Nucleo-cytoplasmic Interactions on Leaf Volatile Compounds from Citrus Somatic Diploid Hybrids

ANNE-LAURE FANCIULLINO,<sup>†</sup> ANNE-LAURE GANCEL,<sup>†</sup> YANN FROELICHER,<sup>‡</sup>  
FRANCOIS LURO,<sup>‡</sup> PATRICK OLLITRAULT,<sup>†</sup> AND JEAN-MARC BRILLOUET<sup>\*,†</sup>

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),  
Département FLHOR, TA50/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France, and Station de Recherches  
Agronomiques (INRA-CIRAD), F-20230 San Giuliano, France

Three diploid citrus somatic hybrids (cybrids) were produced by fusions combining nucellar callus-derived protoplasts of Willow Leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) and Commune clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) with, respectively, leaf protoplasts of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.] and Marumi kumquat [*Fortunella japonica* (Thunb.) Swing.] and leaf protoplasts of Marumi kumquat. Ploidy and origins of the nuclear, chloroplastic, and mitochondrial genomes were investigated by flow cytometry and nuclear and cytoplasmic simple sequence repeat analyses. Volatile compounds were extracted from the leaves of the three cybrids by a pentane/ether (1:1) mixture, analyzed by GC-MS, and compared to those of their parents. The cybrids were found to be very close to their nucleus-giving parent, suggesting that the main information for volatile compounds biosynthesis is contained in the nucleus. However, nucleo-cytoplasmic interactions occurred: the (mandarin + lemon) cybrid, possessing nucleus and chloroplasts of lemon and mitochondria from mandarin, synthesizes more monoterpene alcohols and esters than its nucleus-giving parent; the (clementine + kumquat) cybrid, possessing nucleus from kumquat and organelles from mandarin, synthesizes more monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons and sesquiterpene alcohols than its nucleus-giving parent.

**KEYWORDS:** Citrus; Rutaceae; diploid somatic hybrids (cybrids); leaf volatile compounds; nucleo-cytoplasmic interactions; flow cytometry; SSR markers; nuclear DNA; mitochondrial DNA; chloroplast DNA

### INTRODUCTION

Somatic hybridization by fusion of parental protoplasts is a technique allowing a tremendous increase of the genetic diversity by combining sexually compatible or incompatible parents or distantly related genera and species. It produces allo- and autotetraploid, triploid, and also diploid hybrids (also called *cybrids*) as byproducts (1, 2). Tetraploid hybrids inherit nuclear genomes of their parents (addition of chromosomes) and various parental combinations of cytoplasmic organelles (chloroplasts and mitochondria), whereas diploid ones inherit the nuclear genome of one of the parents and various parental combinations of chloroplasts and mitochondria. Numerous protoplast fusions have been performed in the *Citrus* and related genera and, to date, about 200 kinds of somatic hybrids have been generated in the world (1), of which only 30 are diploids.

Among the aims of somatic hybridization (e.g., production of rootstocks with improved cold hardiness, nematode and

*Phytophthora* resistances, ...) (2–5), obtaining plants bearing fruits of good sensory characteristics is a major goal. Aroma being a major factor of fresh citrus fruit quality and also of their derived products (juices, essential oils, ...), improvement of citrus cultivars through this technique must include the analysis of volatile compounds of the produced hybrids. It has been shown that citrus allotetraploids, although possessing all chromosomes of their parents, do not keep all their parental traits with regard to the biosynthesis of volatile compounds (6–10). On the other hand, cybrids are of considerable interest because, possessing the nuclear genome of only one parent and various combinations of the parental cytoplasmic genomes (chloroplastic and mitochondrial), they are good models for studying the influence of nucleo-cytoplasmic interactions on volatile compound synthesis. To our knowledge, until now, only one paper has been released giving the composition of leaf volatile compounds of a cybrid obtained by fusion of sweet orange and lemon (11).

Diploid somatic hybrids have been obtained by CIRAD (2) and are cultivated at the Station de Recherches Agronomiques INRA-CIRAD (San Giuliano, Corsica, France). They were characterized by flow cytometry and single sequence repeat

\* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33-(0)467617581; fax +33(0)467614433; e-mail brillouet@cirad.fr].

<sup>†</sup> Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD).

<sup>‡</sup> Station de Recherches Agronomiques (INRA-CIRAD).

(SSR) analyses. With the aim of studying the genetic control of volatile compound biosynthesis (i.e., the nucleo-cytoplasmic interactions), we analyzed leaf volatile compounds from three somatic diploid hybrids obtained by fusion of various combinations of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.), lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.], clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), and kumquat [*Fortunella japonica* (Thunb.) Swing.]. Leaves of the parents were also analyzed, and the results are presented hereafter.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant Materials.** The 1-year-old parents, all grafted onto volkameriana rootstock (*Citrus limonia* Osb.) and growing in the same field of the Station de Recherches Agronomiques (INRA-CIRAD) of San Giuliano, were of the following species: mandarin (cv. Willow Leaf; hereafter designated WLM in tables and figures), lemon (cv. Eureka, EUR), clementine (cv. Clémentine Commune, CLM), and kumquat (cv. Marumi, MK). We also analyzed three 1-year-old somatic diploid hybrids (cybrids), obtained by the fusion of protoplasts from (i) nucellar callus line of mandarin and, respectively, leaf-derived protoplasts of lemon [(mandarin + lemon) hybrid = (WLM + EUR)] and kumquat [(mandarin + kumquat) hybrid = (WLM + MK)] and from (ii) nucellar callus line of clementine and leaf-derived protoplasts of kumquat [(clementine + kumquat) hybrid = (CLM + MK)]. Callus-derived protoplasts of clementine were haploid. These hybrids were all grafted onto volkameriana rootstock and planted as their parents the same week in the same field at the Station de Recherches Agronomiques INRA-CIRAD of San Giuliano. For each parent and hybrid, three individual plants were cultivated under totally randomized design.

Batches of leaves were randomly hand-picked, revolving around the shrubs on the same day (February 2003), and immediately air-freighted to our laboratory. Three individual shrubs were sampled for each parent and hybrid, and each batch of leaves was analyzed separately as follows. Leaves (50 g) were cut in half with scissors after removal of the central rib and then ball-milled in liquid N<sub>2</sub> with a Danguomill 300 grinder for 2 min. Finely pulverized leaf powder was then stored under argon at -80 °C before extraction and analysis of volatile compounds the day after.

**DNA Extraction.** Total genomic DNA was extracted according to the method of Doyle and Doyle (12) from leaves of parents (mandarin, lemon, and kumquat) and of the three cybrids and then kept at -80 °C before analysis.

**Cytometry and SSR Analysis.** The ploidy of parents and hybrids was determined by flow cytometry (1). For SSR analysis, 22 primers for nuclear microsatellite amplifications were used: Ci01B10, Ci01C07, Ci01D06a, Ci01E02, Ci01H05, Ci02A04, Ci02A09, Ci02B07, Ci06A08, Ci06A12, Ci06B05, Ci06B07, Ci07B05, Ci07B09, Ci07C09, Ci07D06, Ci07D07, Ci07E05, Ci07E06, Ci07F11, Ci08B08, and Ci08C05 (13). Three chloroplast primers were used: ntcp9 (14), ccmp5 and ccmp6 (15). PCR amplifications of the samples were performed using a PTC-200 thermocycler (MJ Research Inc.) in a 15 µL final volume containing 0.8 unit of *Taq* DNA polymerase (Eurogentec), 10 ng of citrus DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% (v/v) Tween 20, 0.2 µM reverse primer, and 0.2 µM forward primer. The following PCR program was applied: denaturation at 94 °C for 5 min and subjected to 35 repeats of the following cycle: 30 s at 94 °C, 1 min at 50 or 55 °C, 45 s at 72 °C; and a final elongation step of 4 min at 72 °C. Samples were then kept at 4 °C prior to analysis. After the addition of 15 µL of loading buffer [98% formamide, 10 mM EDTA, 0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol], the mixture was denatured at 92 °C for 3 min and kept at 70 °C during gel loading. Six microliters of each sample was loaded in 5% polyacrylamide sequencing gel with 7.5 M urea in 0.5% TBE buffer prior to electrophoresis at 60 W for 1.5–2.5 h. Gels were silver stained using an improved method adapted from that of Beidler et al. (16).

**Extraction of Volatile Compounds.** The solvents (*n*-pentane and ether) were of analytical grade. Reference compounds, when available, and *n*-alkane (C<sub>5</sub>–C<sub>22</sub>) standards were from Aldrich Chimie (Saint

Quentin Fallavier, France). The internal standard (30 µg of *n*-hexanol) was added to leaf powder (500 mg), which was then homogenized using a Potter Elvehjem homogenizer with 20 mL of pentane/ether (1:1) for 5 min. The slurry was then filtered on a glass crucible (porosity = 4) filled with anhydrous sodium sulfate. The extract was finally concentrated at 42 °C to a volume of 2 mL with a 25 cm Vigreux distillation column.

**GC and GC-MS Analysis.** Solvent extracts were analyzed by GC-FID using two fused silica capillary columns of DB-Wax (column A, J&W Scientific, Folsom, CA) (60 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm film) and DB-1 (column B, J&W Scientific) (30 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm film). Oven temperature was increased from 40 °C at a rate of 1.5 °C min<sup>-1</sup> (DB-Wax) or 3 °C (DB-1) to 245 °C, at which it was held for 20 min. On-column injector was heated from 20 to 245 °C at 180 °C min<sup>-1</sup>. Detector temperature was 245 °C. Hydrogen was the carrier gas at 2 mL min<sup>-1</sup>. Injected volumes were 2 µL of concentrated extract.

Solvent extracts were also analyzed by GC-MS using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5973 quadrupole mass spectrometer with electron ionization mode (EI) generated at 70 eV. The ion source and quadrupole temperatures were 230 and 150 °C, respectively, and the filament emission current was 1 mA. Volatile compounds were separated on a DB-Wax column (column A, J&W Scientific) fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film) and on a DB-1 column (column B, J&W Scientific) (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film). Oven temperature was increased from 40 °C at a rate of 3 °C min<sup>-1</sup> to 250 °C, at which it was held for 20 min. On-column injector was heated from 20 to 245 °C at 180 °C min<sup>-1</sup>. Detector temperature was 245 °C. Helium was the carrier gas at 1.1 mL min<sup>-1</sup>. Electron impact mass spectra were recorded in the 40–600 amu range at 1 s intervals. Injected volumes were 1 µL of concentrated extract. Compounds were identified on the basis of linear retention indices on both columns (DB-Wax and DB-1) and EI mass spectra (Wiley 275.L library) from the literature or from authentic standard compounds.

Quantitative data were obtained from the GC-FID analyses. Integration was performed on compounds eluted from the DB-Wax column between 3 and 110 min. Response factors of 10 reference compounds from different classes (monoterpenes, sesquiterpenes, monoterpene alcohols and aldehydes, esters) were determined and found to range from 0.85 to 1.2 versus *n*-hexanol, averaging 1.0. Response factors were therefore taken as 1.0 for all compounds with reference to the internal standard. It was also confirmed that the internal standard was fully recovered after extraction and concentration from a leaf powder, by the separate injection of 2 µL of a standard solution of *n*-hexanol (15 µg mL<sup>-1</sup>) in pentane/ether (1:1). Amounts were expressed as micrograms of *n*-hexanol equivalent per gram of dry weight. Linear retention indices were calculated with reference to *n*-alkanes (C<sub>5</sub>–C<sub>22</sub>). Concentrations (see Table 2) are given as the average of data from three individual shrubs. The total content in volatile compounds of leaves from hybrids and their parents was calculated by summing concentrations of all volatile compounds eluted from the DB-Wax column between 3 and 110 min and expressed as percent of dry weight.

**Statistical Analyses.** For each combination, Euclidian distances were calculated (@DARwin 4.0 software, CIRAD, Montpellier, France) between parents and hybrids (Figure 2). Calculations were based on the average concentrations of each volatile compound from leaves of three individual shrubs (Table 2). The statistical comparison of data was performed by ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., 1989) to reveal significant differences among cybrids and their parents. Least significant differences between means were assessed using Sheffe's test (at *P* < 0.01 and *P* < 0.05).

## RESULTS AND DISCUSSION

A prerequisite to our investigation on nucleo-cytoplasmic interactions influencing volatile compound biosynthesis was to determine the origins in the cybrids of nuclei and organelles (mitochondria and chloroplasts).

**Molecular Analysis.** Analyses by flow cytometry showed that all hybrids were diploids (2*n* = 18). The three citrus somatic

**Table 1.** Characteristics of the Parents and Their Diploid Hybrids (= Cybrids)

parent							ploidy	
mandarin (cv. Willow Leaf, WLM)							2n = 18	
lemon (cv. Eureka, EUR)							2n = 18	
kumquat (cv. Marumi, MK)							2n = 18	
clementine (cv. Commune, CLM; haploid)							n = 9	

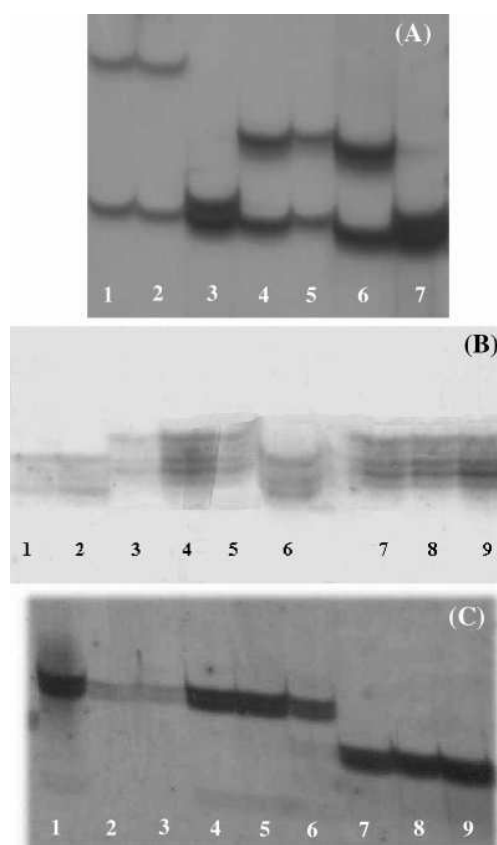
  

cybrid	parent 1	protoplasts	parent 2	protoplasts	nucleus	chloroplasts	mitochondria	ploidy
WLM + EUR	WLM	callus	EUR	leaf	EUR	EUR	WLM	2n = 18
WLM + MK	WLM	callus	MK	leaf	MK	MK	WLM	2n = 18
CLM + MK	CLM	callus	MK	leaf	MK	WLM <sup>a</sup>	WLM <sup>a</sup>	2n = 18

<sup>a</sup> Clementine has chloroplasts and mitochondria from mandarin.

hybrids were produced by fusion of callus-derived protoplasts of mandarin or clementine (embryogenic parents) with leaf-derived protoplasts of lemon or kumquat (leaf mesophyll parents). In citrus somatic hybrids obtained by fusion of leaf protoplasts and embryogenic callus protoplasts, the mitochondrial genome is inherited from the embryogenic parent (2, 17): that was the case of our three cybrids, which inherited mitochondria from their mandarin or clementine parent. As the clementine parent inherited mitochondria from its Willow Leaf mandarin parent (18), we can consider that our three cybrids possess the same WLM mitochondrial genome (**Table 1**). Determination of nuclear and chloroplast DNA origins was performed by SSR analysis. All nuclear and chloroplast primers succeeded in amplifying the three hybrids and their parents. Nuclear and chloroplast primers have been chosen to display polymorphism between parents and therefore allowed us to identify the genome origins of our cybrids (**Figure 1**). The (mandarin + kumquat) hybrid, (WLM + MK), combined the nucleus and chloroplasts from kumquat (**Table 1**). The (clementine + kumquat) hybrid, (CLM + MK), combined the nucleus from kumquat with chloroplasts from mandarin. Concerning the (mandarin + lemon) hybrid, (WLM + EUR), the nucleus and chloroplasts came from lemon. Moreover, analysis of nuclear DNA by 22 SSR markers revealed that the three hybrids possessed bands from one parent only: nuclear genome was apparently transmitted without punctual recombination and/or deletion.

**Volatile Compounds.** The total contents in volatile compounds of leaves (percent dry weight) from the parents were as follows: kumquat, 1.64; mandarin, 1.20; and Eureka lemon, 1.29. The leaf volatile contents of hybrids were as follows: (clementine + kumquat), 1.98; (mandarin + kumquat), 1.70; and (mandarin + lemon), 1.41. It is worth noting that the contents measured in the hybrid leaves were higher than those of their parent leaves (by 4–21%). The compositions of leaf extracts from the hybrids and their respective parents are given in **Table 2**. Each component is given as micrograms of *n*-hexanol equivalent per gram of leaf (dry weight), response factors being taken as 1.0 for all compounds with reference to the internal standard. For each combination, the volatile component profile of the hybrid was qualitatively similar to that of the mesophyll leaf parent. Euclidean distances between cybrids and their parents were calculated on the basis of the average concentration of each volatile compound from leaves of three individual shrubs (**Figure 2**): they shows that each cybrid was closer to its leaf mesophyll parent (lemon or kumquat) than to its embryogenic one (mandarin). In the same way, results obtained with methyl *N*-methylantranilate (compound **74**), a mandarin-specific compound, lead to the same conclusion. This compound was observed in high amount in the leaves of the mandarin parent (embryogenic parent) (8711



**Figure 1.** (A) Nuclear SSR analyses with Ci01C07 primer. Leaf DNA samples were as follows: lane 1, lemon = EUR; lane 2, (mandarin + lemon) cybrid = (WLM + EUR); lane 3, mandarin = WLM; lane 4, (mandarin + kumquat) cybrid = (WLM + MK); lane 5, kumquat = MK; lane 6, (clementine + kumquat) cybrid = (CLM + MK); lane 7, mandarin. (B) Chloroplast SSR analyses with ccmp6 primer. Leaf DNA samples were as follows: lanes 1 and 2, (mandarin + kumquat) cybrid; lanes 3–5, (clementine + kumquat) cybrid; lane 6, kumquat; lanes 7 and 8, (clementine + kumquat) cybrid; lane 9, mandarin. (C) Chloroplast SSR analyses with ntcp9 primer. Leaf DNA samples were as follows: lanes 1–3 (mandarin + lemon) cybrid; lanes 4–6, lemon; lanes 7–9, mandarin.

$\mu\text{g g}^{-1}$ ; 72.9% of the volatile compounds). It was absent in leaves of the other parents and in those of the cybrids.

**Monoterpene Hydrocarbons.** These compounds were weakly represented in kumquat leaves ( $56 \mu\text{g g}^{-1}$ ; 0.3% of total volatiles) (**Table 2**); mandarin and lemon leaves were richer in this class of volatiles with, respectively,  $2881 \mu\text{g g}^{-1}$  (24.1%) and  $5340 \mu\text{g g}^{-1}$  (42.0%).

The (mandarin + lemon) hybrid, (WLM + EUR), which inherited nucleus and chloroplasts from lemon and mitochondria



**Table 2.** Volatile Compounds of Leaves (Micrograms per Gram of Dry Weight and Class Relative Percent) from Parents and Their Diploid Hybrids

no.	compound	RI		WLM <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup>	MK <sup>c</sup>	WLM + EUR <sup>d</sup>	WLM + MK <sup>e</sup>	CLM + MK <sup>f</sup>	reliability of identification <sup>g</sup>
		DB-Wax	DB-1							
monoterpene hydrocarbons										
1	$\alpha$ -pinene	1015	925	120	**136	— <sup>h</sup>	**79	—	2	1
2	$\alpha$ -thujene	1017	920	91	6	—	6	—	—	2
3	camphene	1046	935	—	10	—	5	—	4	1
4	$\beta$ -pinene	1092	962	131	**1735	—	**818	—	—	1
5	sabinene	1110	961	17	*365	—	*184	—	—	1
6	$\delta$ -3-carene	1135	994	—	*56	4	*208	1	5	1
7	$\beta$ -myrcene	1152	983	44	133	11	164	13	20	1
8	$\alpha$ -phellandrene	1153	989	—	10	—	12	—	4	1
9	$\alpha$ -terpinene	1165	1000	11	—	—	—	—	—	1
10	limonene	1190	1018	689	2546	8	3139	15	21	1
11	$\beta$ -phellandrene	1194	1010	—	56	—	51	—	—	1
12	(Z)- $\beta$ -ocimene	1225	1028	14	48	2	42	1	8	1
13	$\gamma$ -terpinene	1232	1043	1497	2	—	9	—	—	1
14	(E)- $\beta$ -ocimene	1240	1039	40	222	*31	192	55	*106	1
15	p-cymene	1252	1002	181	—	—	—	—	—	1
16	$\alpha$ -terpinolene	1269	1072	46	*15	—	*45	—	—	1
	total			2881	5340	*56	4954	85	*170	
	rel %			24.1	42.0	0.3	35.9	0.5	0.9	
monoterpene aldehydes										
17	citronellal	1460	1133	—	114	—	146	—	—	1
18	neral	1660	1213	—	2100	—	2481	—	—	1
19	geranial	1715	1245	—	3325	—	3955	—	—	1
	total			0	5539	0	6582	0	0	
	rel %			0.0	43.6	0.0	47.7	0.0	0.0	
monoterpene alcohols										
20	linalool	1537	1086	29	133	18	162	21	16	1
21	terpinen-4-ol	1578	1145	—	—	—	5	—	—	1
22	1,8-menthadien-4-ol	1644	—	17	—	—	—	—	—	2
23	$\alpha$ -terpineol	1680	1172	32	47	4	44	4	7	1
24	citronellol	1755	1213	—	15	—	15	—	—	1
25	nerol	1784	1213	5	**83	—	**200	1	3	1
26	geraniol	1893	1246	8	108	—	134	—	—	1
	total			91	*386	22	*560	26	26	
	rel %			0.8	3.0	0.1	4.1	0.2	0.1	
monoterpene esters										
27	linalyl acetate	1525	1211	2	—	—	4	1	4	2
28	citronellyl acetate	1655	1336	—	—	—	9	—	—	1
29	neryl acetate	1719	1344	—	*135	—	*237	—	—	1
30	geranyl acetate	1746	1363	—	192	—	209	—	—	1
	total			2	*327	0	*459	1	4	
	rel %			0.0	2.6	0.0	3.3	0.0	0.0	
sesquiterpene hydrocarbons										
31	$\alpha$ -cubebene	1449	1332	—	—	17	—	11	23	1
32	$\delta$ -elemene	1460	1320	—	—	**46	—	52	**72	2
33	$\alpha$ -ylangene	1472	1346	—	—	*37	—	53	*70	2
34	$\alpha$ -copaene	1481	1349	—	—	*19	—	32	*54	1
35	$\beta$ -bourbonene	1504	1362	—	—	182	—	165	280	2
36	$\beta$ -cubebene	1522	1374	—	—	36	—	68	49	2
37	$\beta$ -elemene	1573	1370	—	—	39	—	42	53	2
38	trans- $\alpha$ -bergamotene	1573	1420	—	129	—	106	—	—	2
39	sesquiterpene <sup>i</sup>	1580	—	—	—	92	—	100	123	
40	(E)- $\beta$ -caryophyllene	1581	1396	209	553	91	670	90	93	1
41	3,7-guaiadiene	1594	1414	—	—	239	—	265	295	2
42	sesquiterpene	1605	—	—	—	159	—	187	190	
43	$\beta$ -guaiane	1622	1483	—	—	33	—	30	46	2
44	$\alpha$ -humulene	1649	1429	16	43	210	49	218	235	1
45	(E)- $\beta$ -farnesene	1661	1443	—	—	212	—	233	255	1
46	germacrene D	1693	1471	—	—	7813	—	7030	8154	2
47	$\beta$ -selinene	1702	1458	—	—	*16	—	*56	*43	2
48	bicyclogermacrene	1718	1472	12	165	**26	145	23	**41	2
49	sesquiterpene	1724	—	—	—	—	—	—	10	
50	(E,E)- $\alpha$ -farnesene	1736	1490	—	—	27	—	17	36	2
51	germacrene A	1745	1480	—	—	739	—	778	928	2
52	germacrene C	1754	1493	—	—	377	—	387	450	2
53	$\delta$ -selinene	1756	1509	—	—	1131	—	1161	1351	2
54	germacrene B	1806	1528	—	—	2472	—	2480	2856	2
	total			237	890	14013	970	13478	15707	
	rel %			2.0	7.0	80.8	7.0	79.5	79.8	

Table 2 (Continued)

no.	compound	RI		WLM <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup>	MK <sup>c</sup>	WLM + EUR <sup>d</sup>	WLM + MK <sup>e</sup>	CLM + MK <sup>f</sup>	reliability of identification <sup>g</sup>
		DB-Wax	DB-1							
sesquiterpene alcohols										
55	$\delta$ -cadinol	1955	1555	—	—	490	—	496	574	2
56	(E)-nerolidol	2028	1548	—	41	**79	43	105	**145	1
57	sesquiterpenol <sup>i</sup>	2050	1560	—	—	147	—	144	179	
58	elemol	2058	1520	—	—	**64	—	72	**105	2
59	sesquiterpenol	2068	—	—	—	56	—	55	65	
60	sesquiterpenol	2074	—	—	—	84	—	84	98	
61	sesquiterpenol	2125	—	—	—	52	—	49	63	
62	sesquiterpenol	2150	—	—	—	149	—	183	183	
63	sesquiterpenol	2155	—	—	—	744	—	802	780	
64	sesquiterpenol	2159	—	—	—	183	—	141	208	
65	sesquiterpenol	2161	—	—	—	90	—	70	107	
66	sesquiterpenol	2169	—	—	—	32	—	30	32	
67	sesquiterpenol	2176	—	—	—	172	—	178	187	
68	$\alpha$ -eudesmol	2193	1620	—	—	316	—	333	355	2
69	$\beta$ -eudesmol	2199	1615	—	—	472	—	496	521	2
70	spathulenol	2220	1561	—	—	**86	—	93	**129	2
71	sesquiterpenol	2250	—	—	—	30	—	28	34	
	total			0	41	3246	43	3359	3765	
	rel %			0.0	0.3	18.7	0.3	19.8	19.1	
aliphatic aldehydes										
72	nonanal	1380	1083	—	22	—	20	—	—	1
73	decanal	1485	1184	—	6	—	6	—	—	1
	total			0	28	0	26	0	0	
	rel %			0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	
mandarin esters										
74	methyl N-methylantranilate	2033	1376	8711	—	—	—	—	—	2
75	methyl anthranilate	2188	1332	5	—	—	—	—	—	1
	total			8716	0	0	0	0	0	
	rel %			72.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
others										
76	1,8-cineole	1198	1021	—	40	—	71	—	—	1
77	trans-limonene oxide	1439	1121	3	—	—	—	—	—	1
78	trans-sabinene hydrate	1456	1050	8	15	—	16	—	—	2
79	thymyl methyl ether	1577	1217	3	—	—	—	—	—	2
80	trans-caryophyllene oxide	1962	1580	—	39	—	49	—	—	1
81	thymol	2153	1283	10	—	—	—	—	—	1
82	geranic acid	2287	—	—	55	—	80	—	—	2
	total			24	**149	0	**216	0	0	
	rel %			0.2	1.2	0.0	1.6	0.0	0.0	
total hydrocarbons				3118	6230	14069	5924	13563	15877	
	rel %			26.1	49.1	81.2	42.9	80.0	80.7	
total oxygenated compounds				8833	*6470	3268	*7886	3386	3795	
	rel %			73.9	50.9	18.8	57.1	20.0	19.3	

<sup>a</sup> Mandarin. <sup>b</sup> Lemon. <sup>c</sup> Kumquat. <sup>d</sup> (Mandarin + lemon). <sup>e</sup> (Mandarin + kumquat). <sup>f</sup> (Clementine + kumquat). <sup>g</sup> Key for reliability of identification: 1, identified by linear retention index and mass spectrum of reference compounds; 2, tentatively identified by linear retention index and mass spectrum similar to mass libraries. <sup>h</sup> Not detected. <sup>i</sup> MW = 204. <sup>j</sup> MW = 222. Hybrids and their nucleus-giving parents are significantly different for compounds (>10  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) and classes of compounds (>10  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) bearing one ( $P < 0.01$ ) or two asterisks ( $P < 0.05$ ).

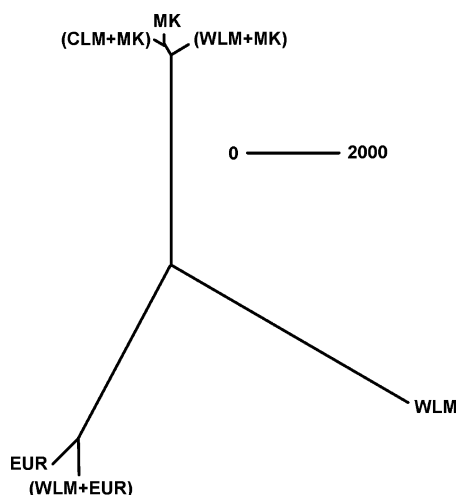
from mandarin, had a total monoterpene hydrocarbon content not significantly different [ $4954 \mu\text{g g}^{-1}$  (35.9%)] from that of its lemon parent. However, when monoterpene hydrocarbons were considered individually, various situations were encountered:

(1) The cybrid leaf contents in  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, and sabinene were significantly lower ( $\sim 50\%$  on average) than those measured in its lemon parent. Furthermore, the relative proportions of these three compounds were similar in the cybrid and its lemon parent ( $\alpha$ -pinene/ $\beta$ -pinene/sabinene, 0.09/1.00/0.22); these proportions compare favorably with those observed in the major reaction products of (–)- $\beta$ -pinene synthase from *Citrus limon* flavedo ( $\alpha$ -pinene/ $\beta$ -pinene/sabinene, 0.05/1.00/0.14) (19); this enzyme is nuclear encoded as a preprotein bearing a transit peptide signal and is imported into the chloroplasts, where it is proteolytically processed into its mature functional form. Thus, it appears that the expression of this nuclear encoded chloro-

plastic enzyme is strongly influenced by the mitochondrial genome of the mandarin embryogenic parent: although not understood, and admittedly the nuclear genome was transmitted without any punctual recombination and/or deletion, this could be a form of nucleo-cytoplasmic interaction. However, one must bear in mind that chloroplastic-mitochondrial interactions may also exist (20).

(2) Conversely, the cybrid leaf contents in  $\delta$ -3-carene and  $\alpha$ -terpinolene were significantly higher ( $\times 3.7$  and 3, respectively) than those measured in its lemon parent. Although no  $\delta$ -3-carene synthase has been purified yet from *Citrus limon*, it was shown that a  $\delta$ -3-carene synthase from *Picea abies* (21) most closely resembles in its deduced primary structure a terpinolene synthase from *Abies grandis* (22). These enzymes employ a very similar cyclization mechanism:  $\delta$ -3-carene and terpinolene are formed from geranyl diphosphate by, respectively, 1,3-elimination or 1,2-elimination of a proton from the





**Figure 2.** Euclidian distances between hybrids and their parents. Mandarin = WLM; lemon = EUR; kumquat = MK; (mandarin + lemon) cybrid = (WLM + EUR); (mandarin + kumquat) cybrid = (WLM + MK); (clementine + kumquat) cybrid = (CLM + MK).

(4*S*)- $\alpha$ -terpinyl carbocation (23). Thus, it appears that the biosynthesis of these two monoterpenes is strongly influenced by the mitochondrial genome of the mandarin embryogenic parent: again, although not understood, this could be a form of nucleo-cytoplasmic interaction.

(3) Other cybrid monoterpenes were not significantly different from those of its lemon parent.

In the (mandarin + kumquat) hybrid, (WLM + MK), that inherited nucleus and chloroplasts from kumquat and mitochondria from mandarin, concentration in total monoterpenes was similar to that of the kumquat parent [ $85 \mu\text{g g}^{-1}$  (0.5%)]. Conversely, in the (clementine + kumquat) hybrid, (CLM + MK), with nucleus from kumquat and organelles from mandarin, concentration of total monoterpene hydrocarbons was significantly higher [ $170 \mu\text{g g}^{-1}$  (0.9%)] than that of the kumquat parent. This increase was due to a significantly higher amount of (*E*)- $\beta$ -ocimene: thus, at least for this compound, the presence of the mandarin chloroplastic DNA in this cybrid seems to stimulate monoterpene hydrocarbon synthesis. The fact that biosynthesis of monoterpenes occurs in chloroplasts (24) should be related with this observation.

**Sesquiterpene Hydrocarbons.** Concentration ranges were as follows (Table 2):  $237 \mu\text{g g}^{-1}$  (2.0%) for the mandarin,  $890 \mu\text{g g}^{-1}$  (7.0%) for the lemon, and  $14013 \mu\text{g g}^{-1}$  (80.8%) for the kumquat parent. The three hybrids showed concentrations not significantly different from those found in their mesophyll parents. Similarly to monoterpenes, when sesquiterpene hydrocarbons were considered individually, various situations were encountered:

(1) The (clementine + kumquat) cybrid, (CLM + MK), showed leaf contents in  $\delta$ -elemene,  $\alpha$ -ylangene, and  $\alpha$ -copaene significantly higher (by  $\times 1.6$ – $2.8$ ) than those measured in its kumquat parent. This is also the case of bicyclogermacrene. It must be noted that  $\alpha$ -ylangene and  $\alpha$ -copaene are two tricyclic diastereomers obtained by cyclization of the cadinyl carbocation; they were observed as minor products of grand fir  $\delta$ -selinene synthase (25). The (mandarin + kumquat) cybrid, (WLM + MK), does not exhibit such differences: because these two above kumquat-derived cybrids differ only by their chloroplasts (Table 1), this emphasizes the possible role of mandarin chloroplasts in the stronger synthesis of these compounds.

(2) The two kumquat-derived cybrids were significantly richer in  $\beta$ -selinene than their kumquat parent.

Such an increase was observed for the sesquiterpene (*E*)- $\beta$ -caryophyllene in the leaves of a (sweet orange + lemon) cybrid with regard to its nucleus-giving lemon parent (11). Thus, although it is not possible to link the above effects to an up-regulation of one or several citrus sesquiterpene synthases, we may have here forms of nucleo-cytoplasmic interactions.

**Oxygenated Compounds.** The amounts of total oxygenated compounds in the parent leaves varied from  $3268 \mu\text{g g}^{-1}$  (18.8%) for the kumquat to  $6470 \mu\text{g g}^{-1}$  (50.9%) for the lemon and to  $8833 \mu\text{g g}^{-1}$  (73.9%) for the mandarin (Table 2). Levels in total oxygenated compounds in two of the cybrids, (mandarin + kumquat) [(WLM + MK);  $3386 \mu\text{g g}^{-1}$  (20.0%)] and (clementine + kumquat) [(CLM + MK);  $3795 \mu\text{g g}^{-1}$  (19.3%)], were not significantly different from those found in the kumquat parent. Conversely, oxygenated compounds were significantly overproduced in the (mandarin + lemon) hybrid [(WLM + EUR);  $7886 \mu\text{g g}^{-1}$  (57.1%)] with regard to its lemon parent. This is due to nerol and neryl acetate, which were significantly overproduced by, respectively,  $\times 2.4$  and  $\times 1.8$  in the (mandarin + lemon) cybrid, (WLM + EUR), with regard to its lemon parent. Conversely, geraniol and geranyl acetate contents were not significantly different from those measured in the lemon.

Similarly to the cases of monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons, the (clementine + kumquat) cybrid, (CLM + MK), exhibited increases in three sesquiterpene alcohols, (*E*)-nerolidol, elemol, and spathulenol, compared with its nucleus-giving kumquat parent: once again, it is distinguishable from the (mandarin + kumquat) cybrid, (WLM + MK), which suggests a nucleo-chloroplastic interaction affecting the biosynthesis of these compounds.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank C. Jacquemond and F. Curk for assistance and Dr. R. Morillon for a helpful review of the manuscript.

## LITERATURE CITED

- Grosser, J. W.; Ollitrault, P.; Olivares-Fuster, O. Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. **2000**, *36*, 434–449.
- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Froelicher, Y.; Carreel, F.; d'Hont, A.; Luro, F.; Bruyère, S.; Cabasson, C.; Lofty, S.; Jouma, A.; Vanel, F.; Maddi, F.; Treanton, K.; Grisoni, M. Apport de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes. *Cahiers Agric.* **2000**, *9*, 223–236.
- Grosser, J. W.; Gmitter, F. G., Jr.; Castle, W. S.; Chandler, J. L. Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: progress report. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* **1995**, *108*, 140–143.
- Grosser, J. W.; Gmitter, F. G., Jr.; Castle, W. S.; Chandler, J. L. Somatic hybridisation: a new approach to citrus rootstock improvement. *Fruits* **1998**, *53*, 331–334.
- Guo, W. W.; Cheng, Y. J.; Deng, X. X. Regeneration and molecular characterization of intergeneric somatic hybrids between *Citrus reticulata* and *Poncirus trifoliata*. *Plant Cell. Rep.* **2002**, *20*, 829–834.
- Fatta Del Bosco, S.; Palazzolo, E.; Scarano, M. T.; Germanà, M. A.; Tusa, N. Comparison between essential oil yield and constituents of an allotetraploid somatic hybrid of *Citrus* and its parents. *Adv. Hortic. Sci.* **1998**, *12*, 72–77.
- Alonzo, G.; Fatta Del Bosco, S.; Palazzolo, E.; Saiano, F.; Tusa, N. Citrus somatic hybrid leaf essential oil. *Flavour Fragrance J.* **2000**, *15*, 258–262.

- (8) Gancel, A.-L.; Ollé, D.; Ollitrault, P.; Luro, F.; Brillouet, J.-M. Leaf and peel volatile compounds of an interspecific Citrus somatic hybrid [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. + *Citrus paradisi* Macfayden]. *Flavour Fragrance J.* **2002**, *17*, 416–424.
- (9) Alonzo, G.; Ramirez, S.; Saiano, F.; Abbate, L.; Ferrante, S.; Scarano, M. T.; Tusa, N. “Redblush” grapefruit + “Avana” mandarin somatic hybrids. Plantlet leaf essential oil study. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2002**, *5*, 60–70.
- (10) Gancel, A.-L.; Ollitrault, P.; Froelicher, Y.; Tomi, F.; Jacquemond, C.; Luro, F.; Brillouet, J.-M. Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6006–6013.
- (11) Alonzo, G.; Fatta Del Bosco, S.; Palazzolo, E.; Saiano, F.; Tusa, N. Citrus cybrid leaf essential oil. *Flavour Fragrance J.* **2000**, *15*, 91–95.
- (12) Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
- (13) Froelicher, Y.; Dambier, D.; Costantino, G.; Lotfy, S.; Didout, C.; Beaumont, V.; Scotto, C.; Brottier, P.; Risterucci, A.-M.; Luro, F.; Ollitrault, P. Isolation and characterisation of 24 microsatellite markers in mandarin, *Citrus reticulata* Blanco. *Mol. Ecol. Notes* **2005**, submitted for publication.
- (14) Bryan, G. J.; McNicoll, J.; Ramsay, G.; Meyer, M. C.; De Jong, W. S. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of *Solanaceae* plants. *Theor. Appl. Genet.* **1999**, *99*, 859–867.
- (15) Weising, K.; Gardner, R. C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **1999**, *42*, 9–19.
- (16) Beidler, J. L.; Hilliard, P. R.; Rill, R. L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 374–380.
- (17) Cabasson, C. M.; Luro, F.; Ollitrault, P.; Grosser, J. W. Non-random inheritance of mitochondrial genomes in *Citrus* hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* **2001**, *20*, 604–609.
- (18) Nicolosi, E.; Deng, Z. N.; Gentile, A.; La Malfa, S.; Continella, G.; Tribulato, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *100*, 1155–1166.
- (19) Lückner, J.; El Tamer, M. K.; Schwab, W.; Verstappen, F. W. A.; Van der Plas, L. H. W.; Bouwmeester, H. J.; Verhoeven, H. A. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3160–3171.
- (20) Zubko, M. K.; Zubko, E. I.; Ruban, A. V.; Adler, K.; Mock, H.-P.; Misera, S.; Gleba, YuYu; Grimm, B. Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+*Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. *Plant J.* **2001**, *26*, 1–14.
- (21) Fäldt, J.; Martin, D.; Miller, B.; Rawat, S.; Bohlmann, J. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *51*, 119–133.
- (22) Bohlmann, J.; Phillips, M.; Ramachandiran, V.; Katoh, S.; Croteau, R. cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the *Tpsd* gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *368*, 232–243.
- (23) Hoelscher, D. J.; Williams, D. C.; Wildung, M. R.; Croteau, R. A cDNA clone for 3-carene synthase from *Salvia stenophylla*. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1081–1086.
- (24) Laule, O.; Fürholz, A.; Chang, H. S.; Zhu, T.; Wang, X.; Heifetz, P. B.; Gruijssem, W.; Lange, B. M. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6866–6871.
- (25) Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2078–2089.

Received for review February 8, 2005. Revised manuscript received April 4, 2005. Accepted April 6, 2005.

JF0502855



# Volatile Compounds from Citrus Diploid Somatic Hybrids

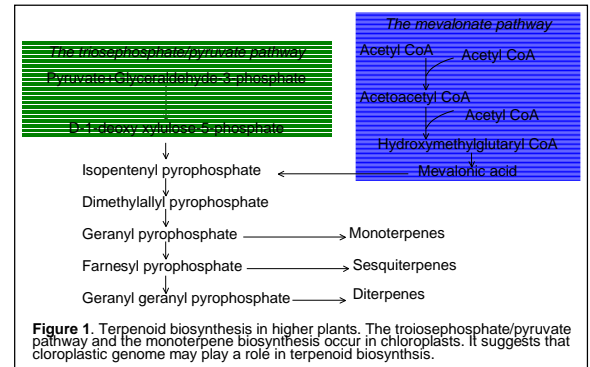
A.-L. Fanciullino<sup>1</sup>, Y. Froelicher<sup>2</sup>, C. Jacquemond<sup>2</sup>, F. Luro<sup>2</sup>, P. Ollitrault<sup>1</sup>, and J.-M. Brillouet<sup>1</sup>

1. CIRAD-Fhlor, Avenue Agropolis 34398 Montpellier Cedex 5, France

2. SRA INRA-CIRAD, San Giuliano 20230 San Nicolao, France

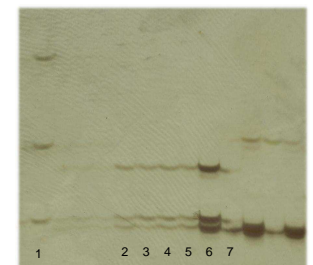
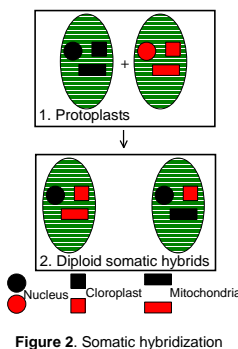
## 1. Introduction

- **Volatile compounds** from peel and leaves are studied to determine their role in citrus fruit quality in order to **improve cultivars**.
- Experiments were performed on **diploid somatic Citrus** (*Citrus deliciosa* cv. Willow Leaf + *Citrus lemon* cv. Eureka (WL+EUR)).
- We focused our work on the **role** played by **chloroplasmic** and **mitochondrial** genomes in the production of volatile compounds (such as **monoterpenoids** and **sesquiterpenoids**).

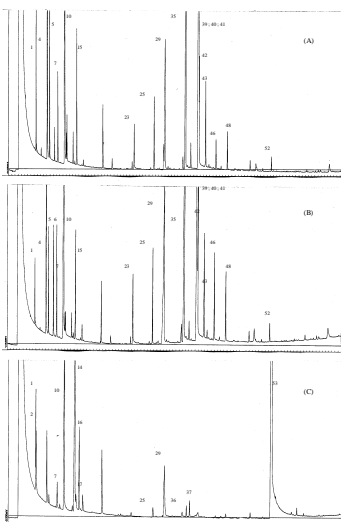


## 2. Characterization of Citrus Somatic Hybrids

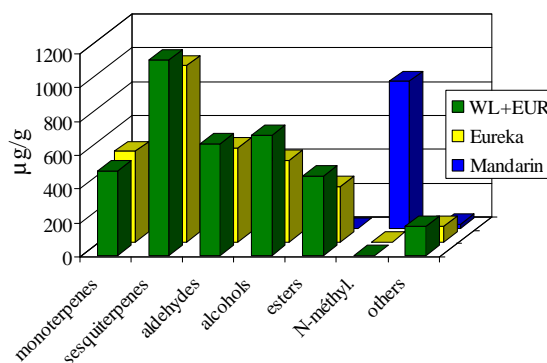
- **Electrofusion of protoplasts** is used for *Citrus* somatic hybridization (figure 2).
- As a result, several combinations of **nuclear, chloroplasmic and mitochondrial genomes** are produced.
- Diploid somatic hybrids combine the **nucleus** from one parent **with the cytoplasm** from the other parent **or** a combination of the **two cytoplasm**s.
- Diploid somatic hybrids are characterized by **flow cytometry** and, **nuclear and chloroplasmic SSR and mitochondrial RFLP analysis** (figure 3).



## 3. Volatile compounds



Volatile compounds from leaves (table 1) are analyzed by GC-MS. The chromatographic profile of the **diploid somatic hybrid (B)** is **similar** to that of the **Eureka lemon parent (A)** and **different** from the **mandarin parent (C)** (figure 4 and 5).



**Table 1.** Order of elution of major components on polar and apolar columns. All compounds are identified by GC-MS and quantified by GC coupled to flame ionisation with an internal standard. For each plant mean and standard error (S.E.) are reported.

Peak Compounds	DB-wax DB-1 (WL+EUR)		Mean µg/g		Mean µg/g		Mean µg/g	
			S.E.	Eureka	S.E.	Mandarin	S.E.	
1 α-Pinene	1009	907	79	7	136	33	120	34
2 α-Thujene	1017	900	6	1	6	2	91	29
5 Sabinene	1095	948	184	19	365	52	16	5
6 δ-3-Carene	1122	984	208	7	56	2	-	-
7 Myrcene	1139	970	163	14	133	16	45	13
10 Limonene	1172	1002	3139	370	2546	263	689	256
14 γ-Terpinene	1216	1038	9	4	2	-	1497	385
15 trans-β-Ocimene	1224	1029	192	20	222	37	40	5
16 p-Cymene	1236	992	-	-	-	-	182	51
17 α-Terpinolene	1251	1070	45	1	15	3	46	11
23 Citronellal	1442	1133	146	28	114	18	-	-
25 Linalool	1515	1086	162	1	133	4	29	7
29 (E)-β-Caryophyllene	1558	1396	670	91	553	131	209	27
35 Neral	1638	1213	2481	231	2100	93	-	-
36 1,8-Menthadien-4-ol	1644	-	-	-	-	-	17	6
37 α-Terpineol	1658	1172	44	9	47	8	32	9
39 Neryl acetate	1689	1344	237	18	135	12	-	-
40 Bicyclogermacrene	1689	1472	145	5	165	25	12	8
41 Geraniol	1689	1245	3954	398	3325	101	-	-
42 β-Bisabolene	1691	1465	180	35	152	26	-	-
43 Geranyl acetate	1717	1363	209	32	192	17	-	-
46 Nerol	1761	1213	200	55	83	17	5	2
48 Geranial	1807	1245	134	12	108	21	8	3
52 (E)-Nerolidol	2002	1548	43	1	41	5	-	-
53 Methyl N-methylanthranilate	2007	1318	-	-	-	-	8711	1322

## 4. Conclusion

- The **main information** for the biosynthesis of volatile compounds is contained in the **nucleus**.
- The **combination** of mitochondria from the mandarin with the nucleus from the lemon **influences** the production of **aldehydes** and **esters**.
- This method **can be applied** to other components such as **acids** or **sugars**.



# Carotenoid compositions are correlated with the genetic diversity organization of Citrus genus



**C**itrus fruits are complex sources of carotenoids with more than 100 kinds of pigments reported in this genus. To understand the origin of the diversity of carotenoid compositions of Citrus fruits, 25 genotypes that belong to the 8 cultivated Citrus species were analyzed.

## Materials and Methods

Juice extracts of mature fruits were analyzed by HPLC: carotenoids were separated along a  $C_{30}$  column; the mobile phases were  $H_2O$  as eluent A, methanol as eluent B and MTBE as eluent C; absorbance was followed at 290, 350, 400, 450, and 470 nm using a photodiode array detector; carotenoids were identified using retention times, absorption spectra, and co-injection with authentic standards; quantification of carotenoids was achieved using calibration curves.

For each genotype at least 3 extractions-saponifications-HPLC analyses were performed. The statistical comparison of data was performed by ANOVA using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., 1989). ©Darwin 4.0 software (CIRAD, Montpellier, France) was used for dissimilarity analysis and tree construction.

## Diversity of carotenoid profiles in pulp of Citrus fruits

25 carotenoids were detected and their chromatographic and spectral characteristics were reported in table 1.

Mandarins, oranges and clementine were the richest species in carotenoid contents (total contents  $\geq 22.481 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Mandarins and clementine accumulated high amount of  $\beta$ -cryptoxanthin whereas oranges accumulated high quantity of *cis*-violaxanthin the  $\beta$ -cryptoxanthin/*cis*-violaxanthin ratio  $> 1.5$  for mandarin and clementine varieties and  $< 0.3$  for oranges varieties.

The comparison of data by ANOVA showed that the 25 genotypes were significantly different for all carotenoid pigments ( $P \leq 0.01 \%$ ).

The main carotenoid in Satsuma mandarin was the  $\beta$ -cryptoxanthin with  $17.507 \pm 0.897 \text{ mg.L}^{-1}$  (peak 17).

Diamante citron accumulated low amounts of carotenoids (total contents  $= 0.179 \pm 0.026 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Star Ruby grapefruit was the richest variety in lycopene with  $10.072 \pm 0.652 \text{ mg.L}^{-1}$  (peak 25) (see figure 1 and 2).

## Organization of the carotenoid diversity

The genotypes were classified in 3 clusters: the mandarin cluster, the citron cluster and the pummelo cluster on the basis of the presence/absence of each compound (figure 3).

These 3 species are the 3 basic taxa of cultivated Citrus. 2 carotenoids strongly determined this classification: the  $\beta$ -cryptoxanthin and the *cis*-violaxanthin. Quantitative data revealed more information at the intraspecific level (figure 4).

For example, in the mandarin group, mandarins and clementine were separated from oranges. Sour oranges, Rangpur lime, Volkamer lemon and Huang pi Chen orange were closer to the citron cluster; these genotypes having low juice contents in carotenoid.

## Conclusion

The carotenoid diversity is highly influenced by genetic factors when other sources of variation such as growing conditions, geographical origin, and fruit maturity are minimized.

As for other phenotypical traits, the general evolution of cultivated Citrus has been the main factor of the organization of carotenoid diversity.

A.L. Fanciullino<sup>1</sup>\*,  
C. Dhuique-Mayer<sup>1</sup>,  
F. Luro<sup>2</sup>, J. Casanova<sup>3</sup>,  
R. Morillon<sup>1</sup> and P. Ollitrault<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIRAD, Département FLHOR, TA50/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France (anne-laure.fanciullino@cirad.fr)

<sup>2</sup>INRA, Unité GEQA, Site de San Giuliano, F-20230

San Giuliano, France

<sup>3</sup>Université de Corse, Equipe Chimie et Biomasse, UMR CNRS 6134, F-20000 Ajaccio, France

Table 1. Chromatographic and spectral characteristics of 25 carotenoids found in juices

RT		Tentative identification	$\lambda_{\text{max}}$ (nm) (observed)				
n°	(min)±SD <sup>a</sup>		Peak I	Peak II	Peak III	% III/II	
1	15.76±0.09	<i>cis</i> -apocarotenoid	c18328	408	430	458	
2	16.33±0.04	<i>cis</i> -neoxanthin	c18328	416	439	468	76
3	17.35±0.04	neochrome		399	422	448	75
4	17.96±0.05			400	422	448	
5	18.71±0.07	<i>cis</i> -violaxanthin	c18328	412	436	464	81
6	19.59±0.04	luteoxanthin		396	418	443	75
7	19.92±0.04	mutatoxanthin		404	426	448	31
8	20.57±0.09	Lutein <sup>b</sup>		422	444	472	48
9	20.78±0.06			407	428	451	
10	21.89±0.04	zeaxanthin <sup>b</sup>		426	450	476	17
11	22.55±0.04	<i>cis</i> -antheraxanthin	c18330	417	440	468	47
12	24.25±0.06			422	446	473	44
13	25.40±0.09	<i>cis</i> - $\beta$ -cryptoxanthin	c18338	420	444	470	
14	25.89		406	428	452	40	
15	26.10±0.04	zeinoxanthin		422	445	473	47
16	26.96±0.06	phytoene		276	286	298	
17	28.16±0.08	$\beta$ -cryptoxanthin <sup>b</sup>		427	450	477	20
18	28.59±0.03	phytoluene		331	348	368	68
19	32.25±0.09	$\zeta$ -carotene		379	400	424	90
20	33.35±0.09	$\alpha$ -carotene		422	444	470	34
21	35.51±0.09	$\beta$ -carotene <sup>b</sup>			452	477	12
22	36.84±0.09	<i>cis</i> - $\beta$ -carotene	c18342	425	449	475	
23	38.82±0.04			433	456	488	
24	45.95	<i>cis</i> -lycopene	c18355	441	466	490	
25	55.57±0.06	lycopene <sup>b</sup>		446	472	502	71

aRT, retention time. ±SD, standard deviation. bidentified using authentic standards.

RT, retention time; ±SD, standard deviation. Identified using authentic standards.

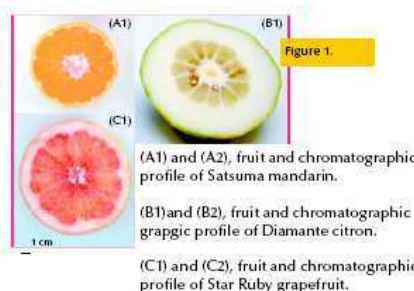


Figure 1.

(A1) and (A2), fruit and chromatographic profile of Satsuma mandarin.

(B1) and (B2), fruit and chromatographic profile of Diamante citron.

(C1) and (C2), fruit and chromatographic profile of Star Ruby grapefruit.

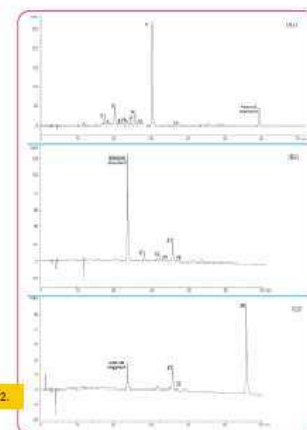


Figure 2.

Figure 3. Structuration of the 25 genotypes based on the presence/absence of each carotenoid.

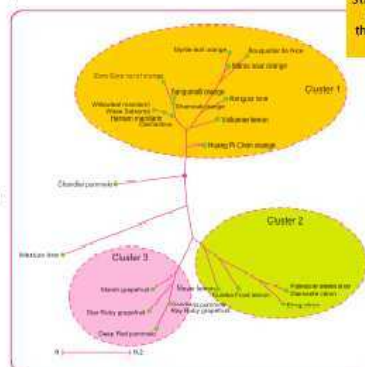


Figure 4. Structuration of the 25 genotypes based on the concentration of each carotenoid.

Thanks  
This work was granted by the Collectivité territoriale de Corse and the CIRAD.



Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement  
Département des productions fruitières et horticoles

## RESUME

### ETUDE DES DETERMINANTS GENETIQUES ET MOLECULAIRES DE LA VARIABILITE DES COMPOSITIONS EN CAROTENOÏDES AU SEIN DU GENRE CITRUS

Les caroténoïdes sont des déterminants majeurs de la qualité des agrumes. Ces pigments jaune, orange ou rouge donnent aux fruits leur couleur attractive. Les caroténoïdes ont plusieurs rôles biologiques : provitamines A et antioxydants, propriétés à l'origine de leur rôle dans la prévention de certains cancers et des maladies cardiovasculaires. Avec plus de 100 molécules isolées dans les fruits, les agrumes ont des compositions complexes et variées en caroténoïdes. L'objectif de ce travail était d'identifier les déterminants génétiques et moléculaires de la diversité des compositions en caroténoïdes. La structuration de cette diversité au sein du genre *Citrus*, a été confrontée à celle observée pour les fragments chromosomiques porteurs des gènes de la chaîne de biosynthèse (RFLP) et à la variabilité d'expression de ces mêmes gènes. La diversité allélique a été étudiée pour un de ces gènes (*Lcy-b*) par DHPLC et séquençage.

La diversité des compositions en caroténoïdes a été déterminée par l'analyse de 25 génotypes représentant les 8 espèces cultivées d'agrumes. Les caroténoïdes des jus ont été analysés par HPLC. La variabilité génétique apparaît comme un des facteurs majeurs de la diversité des compositions en caroténoïdes des agrumes. De plus la classification obtenue sur la base des compositions qualitatives en caroténoïdes, est en accord avec les classifications précédemment établies. Nous retrouvons en effet une structuration en trois groupes correspondant aux trois taxons ancestraux des espèces cultivées. Nous suggérons ainsi que l'histoire de l'évolution des agrumes est le principal facteur d'organisation de la diversité des compositions en caroténoïdes. Nous avons également proposé quelles pourraient être les étapes clés de la structuration de la diversité des teneurs en caroténoïdes chez les agrumes.

L'analyse de l'origine phylogénétique des fragments d'ADN porteurs de sept gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes a été déterminée par l'utilisation de marqueurs RFLP et SSR pour les mêmes variétés. Le nombre de copies des gènes varie de un pour le gène *Lcy-b* à trois pour le gène *Zds*. La structuration de la diversité génétique des agrumes mise en évidence par ces analyses RFLP et SSR est en accord avec les organisations obtenues précédemment par l'utilisation de marqueurs moléculaires neutres. L'origine phylogénétique des allèles présents chez les espèces secondaires a pu être proposée pour quatre de ces gènes. L'implication de cette variabilité de l'origine phylogénétique des fragments d'ADN sur la diversité allélique au niveau de la séquence génique proprement dite a été démontrée pour le gène *Lcy-b* par DHPLC. Nos résultats suggèrent que la variabilité allélique des gènes *Lcy-b* et *Lcy-e* codant pour les deux lycopènes cyclases est impliquée dans la variabilité de ces deux étapes de cyclisation du lycopène pour la formation de l' $\alpha$  ou du  $\beta$ -carotène.

Le niveau d'expression des sept gènes a été estimé par PCR en temps réel à partir des jus de quatre oranges (*C. sinensis*), d'un citron (*C. limon*) et d'un pamplemousse (*C. maxima*). L'augmentation des quantités de transcrits des gènes *Dxs*, *Psy*, *Pds*, *Zds*, *Hy-b* et *Zep* s'accompagne de l'accumulation des  $\beta$ , $\beta$ -xanthophylles dans le jus des oranges Shamouti et Sanguinelli. De plus, les faibles concentrations en caroténoïdes totaux dans les jus de l'orange Huang pi Chen, du citron Eureka et du pamplemousse Deep Red pourraient être liées à une sous-expression des gènes *Dxs* et *Psy*. Le niveau d'expression du gène *Dxs*, influencerait la synthèse des caroténoïdes et serait coordonné avec celle du gène *Psy*.

---

**Mots-clés :** caroténoïdes, *Citrus*, phylogénie, diversité génétique, expression génique, HPLC, marqueurs RFLP et SSR, DHPLC, PCR en temps réel.

---

Université de Corse, Equipe Chimie et Biomasse, UMR CNRS 6134, Route des Sanguinaires, F-20000 Ajaccio. CIRAD, UMR QUALISUD Avenue J. F. Breton - TA B-95 / 16 – F-34398 Montpellier Cedex 5. INRA, UR GEQA Site de San Giuliano, F-20230 San Giuliano.